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

Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar

Ana Paula de Souza Pallu

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

Piracicaba
2010

Ana Paula de Souza Pallu
Engenheiro Agrônomo

Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar

Orientador:
Profa. Dra. **Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner**

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

Piracicaba
2010

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

Pallu, Ana Paula de Souza
Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar / Ana Paula de Souza Pallu. - - Piracicaba, 2010.
129 p. : il.

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

1. Cana-de-açúcar 2. Fungos 3. Genética microbiana 4. Metabólitos secundários 5. Microrganismos endofíticos 6. Penicillium I. Título

CDD 633.61
P169p

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

OFEREÇO

A Deus pela proteção e a minha família

A minha mãe, Zilda Maria Sabino de Souza Pallu, que é mais que uma mãe, é um anjo na Terra, meu porto seguro, minha grande e eterna amiga.

Ao meu pai, Dorivaldo Tadeu Pallu, que é um exemplo de pessoa integra e dedicada à família.

Ao meu grande amor André Camargo Tozadori, por crescer ao meu lado, por me fazer uma pessoa ainda mais feliz e amada, por dividir momentos inesquecíveis e principalmente por ter me dado a maior riqueza da minha vida, o Pedro.

Dedico esse trabalho também ao ser humano que fez com que eu sentisse o maior amor do mundo, Pedro Pallu Tozadori. Obrigada Pedro por me ensinar que a vida é feita de pequenos detalhes, já que um simples sorriso passa a ter um valor imenso. Por ter realizado o maior dos meus sonhos, a maternidade. Mas principalmente por fazer acreditar que a realidade pode ser melhor que o sonho...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre ilumina e guia meu caminho.

À ESALQ/USP pela minha formação profissional e pessoal.

À Professora Drª. Aline Pizzirani-Kleiner pela orientação repleta sempre de muita atenção e principalmente carinho. Obrigada por dividir esses momentos especiais de minha vida e também pela liberdade concedida para a execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Welington Luiz de Araújo pela constante co-orientação e pelo exemplo de profissional.

Ao Professor Dr. João Lúcio de Azevedo pelo exemplo de profissional e valiosas sugestões no exame de qualificação.

Ao Centro de Tecnologia Canavieria (CTC), em especial à Drª. Sabrina Moutinho Chábregas, pela disponibilização das plantas de cana-de-açúcar utilizadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas pela disponibilização do Microscópio de Fluorescência, em especial a Silvia C.M. Molina e aos professores Drª. Margarida L.R. de Aguiar-Perecin e Dr. Mateus Mondin.

Ao Professor Carlos Alberto Labate pela disponibilização das linhagens desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ-USP, em especial Berdã, Cândida Vanderléia de Oliveira, Neusa M. S. Rocha, Fernando Leopoldino, Valdir Próspero e Carlos R. Macedônio.

Aos professores do departamento de Genética pela colaboração e ensinamentos.

Ao CNPq pela concessão das bolsas de estudo, desde a Iniciação Científica.

À Léia Cecília de Lima Fávaro pela enorme colaboração nesse trabalho, sem a qual o mesmo não teria sido possível. Pela grande dedicação, pelas dicas, por passar conhecimentos adquiridos, por demonstrar uma tranquilidade nunca antes conhecida e pela amizade. Certas pessoas entram em nossas vidas como anjos, com certeza você foi um anjo que passou em minha vida.

Ao amigo Anderson Ferreira pelo auxílio nas análises de microscopia de fluorescência e pela amizade.

À todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos Professor João Lúcio de Azevedo, do Departamento de Genética da ESALQ-USP, os quais não só dividi conhecimentos, mas também momentos de alegria e muita diversão, que serão levados para sempre em meu coração e em minha memória: Aldo Procópio, Alessandro Riffel, Armando Dias, Camila, Carlos I. Aguilar-Vildoso, Cláudia S. Gai, Cristina S. Maki, Cristiane Fasanella, Danice Luvizotto,

Fernanda Bernardes, Fernando D. Andreote, Francisco D. Andreote, Laura Assunção, Michele Silva, Paulo T. Lacava, Priscilla B. Rossetto, Rodrigo Mendes, Rudi E. Procópio, Sarina Tsui, Uira C. F. Belmonte, Vanessa dos Santos.

Aos amigos do grupo de estudos de Ecologia Humana do Laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais e Ecologia Humana, do Departamento de Genética da ESALQ-USP, em especial, Professora Dra. Silvia Maria Guerra Molina, Gabriel H. Lui, Mariana Piva, Laila Caroline Z. Fraccaro, Jorge Ferrer Uri, Julia Faro e Helena Gonçalves, pela troca de conhecimento e pelas conversas repletas de amizade e diversão.

Ao amigo José Antônio da Silva, grande Zezão, pela constante ajuda e principalmente pelos momentos de descontração, com muita bagunça e risadas.

À Joelma pelo exemplo de guerreira e amiga.

Às meninas do Laboratório: Aline da Silva Romão (Romã), Andréa Bogas, Fernanda Sebastianes (Fer), Maria Carolina Quecine (Carolzinha), Marise Suzuki, Renata Assis e Viviane Colombari pela amizade, pelas muitas conversas durante o trabalho e, principalmente pela atenção durante minha gestação.

À minha grande amiga Maria Beatriz Calderan Rodrigues, à qual agradeço pelas grandes contribuições nesse trabalho e por essa amizade única e sincera. Como eu sempre digo: só nós duas sabemos o que nós passamos...foram momentos únicos de muita parceria, amizade, divisão de afeto e compreensão.

À minha família por todos os momentos de união, amor, compreensão e alegria partilhados. E principalmente por acreditarem nos meus sonhos. Não seria ninguém sem vocês: Dorivaldo Tadeu Pallu, Zilda Maria Sabino de Souza Pallu, André Luis de Souza Pallu, Glaucia Romano Pallu, Marina de Mello Vieira, Doralice Custódio Pallu, Natal Tozadori, Maria Camargo Tozadori, Família Cannavan, Família Pereira e todos os meus familiares. As amigas Taís Carolina Toledo e Lígia Aíra de Medeiros.

Ao meu irmão André Luis de Souza Pallu e minha cunhada Glaucia Romano Pallu pela ajuda, principalmente por serem padrinhos tão carinhos e presentes na vida do Pedro.

Ao grande amor da minha vida, André Camargo Tozadori, pelo exemplo de determinação, dedicação e profissionalismo. Também por dividir momentos especiais da minha vida, sempre de forma alegre e repletos de amor. Você é o melhor pai que eu podia ter escolhido para o nosso Pedro.

Ao Pedro Pallu Tozadori pelo turbilhão de sentimentos que fez aflorar em mim e principalmente por me fazer conhecer o maior amor de todos: o amor incondicional.

Gostaria de agradecer de forma sincera a todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

"Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele conquistará o mundo"

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO 13

ABSTRACT 15

1 INTRODUÇÃO 17

2 DESENVOLVIMENTO 18

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

2.1.1 Fungos associados às plantas 18

2.1.1.1 Aspectos gerais 18

2.1.1.2 Fungos endofíticos e suas potencialidades 22

2.1.2 O gênero *Penicillium* 26

2.1.3 Ferramentas utilizadas no estudo da interação fungo-planta 28

2.1.3.1 Aspectos básicos da transformação genética de fungos 28

2.1.3.2 Transformação genética de fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens* 30

2.2 MATERIAL E MÉTODOS 36

2.2.1 Material biológico e condições de cultivo 36

2.2.2 Extração e manipulação de DNA genômico 36

2.2.3 Ensaios de antagonismo contra fungos fitopatogênicos 37

2.2.4 Secreção de enzimas hidrolíticas em meio de cultura sólido 38

2.2.5 Solubilização de fosfato inorgânico 39

2.2.6 Produção de ácido indol acético (AIA) 40

2.2.7 Transformação genética do fungo endofítico de cana-de-açúcar *Penicillium pinophilum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* 41

2.2.7.1 Isolado fúngico 41

2.2.7.1.1 Identificação molecular 41

2.2.7.1.2 Teste de sensibilidade do isolado 44 a higromicina B 42

2.2.7.1.3 Obtenção e preparo dos conídios 42

2.2.7.2 Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* 43

2.2.7.3 Vetor de transformação 43

2.2.7.4 Otimização do protocolo de transformação 44

2.2.7.5 Purificação e estoque dos transformantes 46

2.2.7.6 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes 46

2.2.7.7 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF) 47

2.2.7.8 Confirmação da transformação genética por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 48

2.2.7.9 Análise de *Southern blot* 48

2.2.7.9.1 Extração do plasmídio pFAT-gfp 50

2.2.7.9.2 Hibridação molecular 50

2.2.7.10 Amplificação, clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA .. 50

2.2.7.11 Interação de *P. pinophilum* e arroz 52

2.2.7.12 Interação de *P. pinophilum* e cana-de-açúcar 53

2.2.7.12.1 Análise *in vitro* da interação de transformantes de *P. pinophilum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por microscopia óptica de fluorescência (MOF) 53

2.2.7.12.2 Análise *in vitro* da interação de transformantes de *P. pinophilum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por reisolamento 54

2.2.7.13 Construção de iniciadores 54

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

2.3.1 Material biológico 55

2.3.2 Atividade antifúngica 58

2.3.3 Secreção de enzimas hidrolíticas 61

2.3.4 Solubilização de fosfato inorgânico 71

2.3.5 Produção de ácido indol acético (AIA) 75

2.3.6 Transformação genética do fungo endofítico de raiz de cana-de-açúcar *Penicillium pinophilum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* 78

2.3.6.1 Identificação molecular 78

2.3.6.2 Sensibilidade a higromicina B 80

2.3.6.3 Transformação genética de *P. pinophilum* mediada por *A tumefaciens* 81

2.3.6.4 Efeito dos diferentes parâmetros sobre a eficiência da transformação 82

2.3.6.5 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes 87

2.3.6.6 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF) 87

2.3.6.7 Confirmação da transformação genética por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 89

2.3.6.8 Análise de *Southern blot* 90

2.3.6.9 Amplificação, clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA 92

2.3.7 Interação de *P. pinophilum* e arroz 95

2.3.8 Interação de *P. pinophilum* e cana-de-açúcar 97

2.3.8.1 Análise *in vitro* da interação de transformantes de *P. pinophilum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por microscopia óptica de fluorescência (MOF) 98

2.3.8.2 Análise *in vitro* da interação de transformantes de *P. pinophilum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por reisolamento 102

2.3.9 Avaliação da biblioteca de transformantes em relação a secreção de pectina liase e poligalacturonase 104

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS 107

REFERÊNCIAS 109

RESUMO

Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar

Os fungos endofíticos têm sido reconhecidos pela sua grande importância para as plantas hospedeiras, pois podem conferir proteção contra insetos herbívoros e patógenos, promover o crescimento vegetal, além de produzir metabólitos secundários com atividades biológicas diversas, entre outros. A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância social e econômica no Brasil, especialmente para o estado de São Paulo. Ultimamente esta cultura vem recebendo especial atenção devido ao crescente aumento da demanda de matéria prima, principalmente em função do acréscimo no consumo de etanol como biocombustível. Fungos do gênero *Penicillium* habitam os tecidos e a rizosfera de cana-de-açúcar, onde podem estabelecer associações mutualísticas com a planta e conferir diversos benefícios. Dentro deste contexto, estudos que avaliem a interação de *Penicillium* spp. com cana-de-açúcar são bastante promissores para geração de conhecimentos que auxiliem na otimização da agricultura. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos a avaliação do potencial biotecnológico dos endofíticos de raiz e da rizosfera, do gênero *Penicillium,* pertencentes à comunidade fúngica de cana-de-açúcar, por meio de ensaios de antagonismo, produção de enzimas, solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indol acético; assim como o estudo da interação de um isolado de *P. pinophilum* com cana-de-açúcar a partir do desenvolvimento de um sistema de transformação genética mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens.* Tanto a análise da atividade antimicrobiana como a produção de metabólitos apresentaram extensa variação fisiológica entre os isolados avaliados. Um isolado da espécie *P. pinophilum* (linhagem 44) foi escolhido para ser usado na transformação genética por mostrar-se superior estatisticamente em relação aos demais isolados nos ensaios anteriores. Para aumento da eficiência deste sistema de transformação foram avaliados diferentes parâmetros, dentre eles: tempo de co-cultivo (24 e 48 horas), concentração do indutor acetoseringona (200 μM e 400 μM) e tipos de membrana (papel filtro e náilon). O sistema de agrotransformação apresentou alta eficiência (482 transformantes por 10^7 conídios), gerando uma elevada quantidade de transformantes resistentes à higromicina B e expressando GFP. Dentre os parâmetros avaliados, a combinação que deu origem aos melhores resultados de transformação envolveu o co-cultivo por 48 horas sobre membrana de náilon, em meio de cultura contendo 200 μM de acetoseringona. A interação fungo-planta foi avaliada a partir da inoculação de *P. pinophilum* linhagem selvagem e transformantes, em plântulas de cana-de-açúcar, seguida da análise por microscopia óptica de epifluorescência e reisolamento. Os resultados revelaram a natureza não patogênica desse fungo, uma vez que ele foi capaz de colonizar endofiticamente cana-de-açúcar e persistir nas raízes desta planta, sem levar ao desenvolvimento de qualquer sintoma de doença. Além disso, os ensaios de agrotransformação deram origem a uma biblioteca com mil e cem transformantes insercionais, o que constitui uma ferramenta importante para o estudo molecular do metabolismo secundário desse fungo endofítico e poderá contribuir para o entendimento da interação do complexo fungo-cana-de-açúcar, possibilitando no futuro a sua aplicação no melhoramento vegetal e exploração do seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Endofítico; Antagonismo; Metabólitos secundários; Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*; Gene *gfp*; Interação fungo-planta

ABSTRACT

Biotechnological potential of fungi *Penicillium* and interaction with sugarcane

Endophytic fungi have been recognized for its great importance for the host plants, they may provide protection against herbivores and pathogens, promote plant growth, and produce secondary metabolites with biological activity, among other benefits. Sugarcane is a socially and economically important crop in Brazil, especially for the state of São Paulo. Lately, this culture has received special attention due to the growing demand for raw materials, mainly due to the increase in consumption of ethanol as a biofuel. Fungi *Penicillium* inhabit the tissues and rhizosphere of sugarcane, where they can establish mutualistic associations with the plant and provide several benefits. Within this context, studies evaluating the interaction of *Penicillium* spp. with sugar cane are very promising to generate knowledge in order to assist in the agriculture optimization. Thus, this study aimed to evaluate the biotechnological potential of endophytic Penicillium from root and rhizosphere, belonging to the fungal community of sugarcane, through tests of antagonism, enzyme production, solubilization of inorganic phosphate and indole acetic acid production, as well as studying the interaction of an isolate of *P. pinophilum* with sugarcane using the development of a system for genetic transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens. Both the analysis of antimicrobial activity and the production of metabolites showed extensive physiological variation among isolates. An isolate of the species *P. pinophilum* (strain 44) was chosen to be used in genetic transformation for being statistically superior than the other strains in previous trials. Different parameters were evaluated to increase the efficiency of this transformation system, among them: co-culture time (24 and 48 hours), concentration of the inducer acetosyringone (200 μM and 400 μM) and types of membrane (filter paper and nylon). Agrotransformation system showed high efficiency, generating a high amount of hygromycin B resistant transformants that expressed GFP. Among the factors evaluated, the combination that showed the best results involved the transformation with a co-cultivation for 48 hours on a nylon membrane, in culture medium containing 200 μM of acetosyringone. The plant-fungus interaction was assessed from the inoculation of wild type and transformants *P. pinophilum* in seedlings of sugarcane followed by analysis by epifluorescence microscopy and reisolation. Results revealed the non-pathogenic nature of this fungus, since it was capable of endophytically colonize sugarcane and persisted in the roots of this plant, without developing any symptoms of illness. In addition, agrotransformation tests gave rise to a library with a thousand and one hundred insertional transformants, which is an important tool for molecular study of secondary metabolism of endophytic fungus, and may contribute to the comprehension of the complex interaction of fungus-sugarcane, allowing its future application in plant breeding and exploitation of their biotechnological potential.

Keywords Endophyte; Antagonism; Secondary metabolites; Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*; *gfp* gene; Interaction

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar, a qual é destinada para fabricação de açúcar e álcool. O Estado de São Paulo caracteriza-se como o maior produtor dessa cultura no país, o mesmo ocorrendo para a produção de açúcar e álcool. Entre as razões para esta eficiência na produtividade estão a grande experiência com a cultura e a alta tecnologia utilizadas na produção de cana-de-açúcar no Brasil, a qual é responsável pela redução dos custos e aumento da produção. Além disso, projetos de pesquisa na área biotecnológica, como o sequenciamento do genoma de cana-de-açúcar e estudo de expressão de genes, permitiram o desenvolvimento de novas variedades, as quais incluem plantas geneticamente modificadas que são resistentes a herbicidas (glifosato e imidazolinona) ou insetos (gene *cryA*$_1$ de *Bacillus thuringiensis*).

Uma grande diversidade de microrganismos vive em interação com as plantas, as quais podem ser consideradas um microecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados. Estes nichos incluem não somente as superfícies externas da planta, mas também os tecidos internos, nos quais fungos e bactérias endofíticos podem habitar sem causar dano aparente ao hospedeiro ou desenvolver estruturas externas.

Grande parte das pesquisas com microrganismos endofíticos foram realizadas com plantas de clima temperado, contudo, sabe-se que a diversidade em plantas de clima tropical é maior, para isso revisões recentes têm sido publicadas sobre a ocorrência e distribuição de endofíticos em plantas de clima tropical e sub-tropical. Entretanto, como esses estudos ainda são incipientes se faz necessário pesquisa mais detalhada sobre interações dos endofíticos com plantas de clima tropical, visando entender melhor as funções desses microrganismos na planta hospedeira e avaliação do potencial biotecnológico dos mesmos.

O gênero *Penicillium* possui grande importância, sendo utilizado como organismo modelo em diversos estudos de pesquisa básica e pesquisa aplicada, por exemplo controle biológico, secreção de metabólitos secundários, fonte de novos fármacos para indústria farmacêutica, fonte de enzimas de interesse industrial, entre outros. Esse gênero tem sido frequentemente isolado como endofítico em tecidos de diversas plantas. Pesquisas anteriores do Laboratório de Genética de Microrganismos "Professor Dr. João Lúcio de Azevedo" – ESALQ/USP, Departamento de Genética, mostraram uma grande abundância desse gênero na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, tanto na forma de endófito de raízes como habitando a rizosfera da planta.

Nesse contexto, estudos sobre comunidades microbianas associadas à cana-de-açúcar podem fornecer aspectos científicos básicos e aplicados relativos ao cultivo da cana-de-açúcar no Brasil, e que podem auxiliar no entendimento dessas interações. Sendo assim do ponto de vista de pesquisa aplicada, o presente estudo buscou avaliar o potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar (endofíticos de raiz e rizosfera). Para isso foram realizados ensaios de antagonismo, produção de enzimas, solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indol acético. Já do ponto de vista de pesquisa básica, este trabalho buscou desenvolver um sistema de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, para inserção dos genes da proteína verde fluorescente (GFP) e resistência à higromicina B no genoma do fungo *Penicillium pinophilum*, um endófito de raiz de cana-de-açúcar, visando à análise da interação com cana-de-açúcar e obtenção de uma biblioteca de transformantes insercionais.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Fungos associados às plantas

2.1.1.1 Aspectos gerais

Como descrito por Hawksworth (1991, 2001), o número estimado de espécies de fungos é de 1,5 milhão. Porém outros autores estimam a existência de 8,25 milhões de espécies fúngicas (ARNOLD et al., 2000; FRÖHLICH; HYDE, 1999), entretanto o número de espécies descritas até o momento é de aproximadamente 100 mil (HAWKSWORTH, 2004; NAKAYASHIKI, 2005), o que representa menos de 7% da diversidade total estimada, considerando a estimativa de 1,5 milhão de espécies, e menos de 1,2%, considerando a estimativa de 8,25 milhões de espécies. Dentro desse contexto de vasta diversidade fúngica, é possível afirmar que existe um grande potencial a ser explorado, seja para estudos de aplicações biotecnológicas como para a descrição de novas espécies.

Dois terços das espécies de fungos conhecidas estabelecem íntimas relações parasíticas, comensalísticas ou mutualísticas com outros organismos vivos (BARBIERI; CARVALHO, 2001). Um grande número dessas espécies fúngicas vive associado aos vegetais, seja na superfície, no interior dos tecidos ou na rizosfera. Atualmente, devido às inúmeras pesquisas de isolamento de microrganismos sabe-se que todas as espécies de plantas são potenciais hospedeiros para diversos fungos. Apesar de muitos fungos serem responsáveis por doenças em plantas, causar doença é preferencialmente uma exceção do que uma regra, ou seja, grande parte das interações naturais entre fungos e plantas não leva a manifestação de uma doença (AGRIOS, 1997). A maioria dessas interações não resulta em patogênese, visto que o fungo não é patogênico à planta, provavelmente porque este fungo não possui fatores essenciais para expressar a patogênese (HEATH, 1997).

No entanto, aproximadamente 10% de todas as espécies conhecidas de fungos podem causar doenças em plantas, sendo alguns destes fungos considerados como parasitas obrigatórios, estando associados ao hospedeiro durante todo seu ciclo de vida. Outros, saprófitas, podem proliferar tanto em tecido vivo como em restos de material vegetal morto, enquanto que os parasitas não obrigatórios dependem da planta em alguns estágios de seu ciclo de vida. Estas diferenças no estilo de vida requerem adaptações específicas ao hospedeiro, como visto para fungos patogênicos biotróficos obrigatórios, como ferrugens e míldios, os quais vivem em íntimo contato com seu hospedeiro sem induzir morte de células e respostas de defesa, enquanto que patógenos necrotróficos podem causar necroses em penetração avançada. Patógenos biotróficos facultativos podem ser cultivados em condições axênicas, mas, alguns como *Ustilago maydis*, necessitam íntimo contato com a planta hospedeira para concluir seu ciclo de vida sexual (KAHMANN; BASSE, 2001). Fungos hemibiotróficos como *Phytophthora infestans*, *Cladosporium fulvum*, *Magnaporthe grisea* e *Colletotrichum* spp. podem completar seu ciclo de vida fora da planta, mas desenvolvem estruturas especializadas durante a infecção que não são observadas durante crescimento axênico, sugerindo que a interação com a planta ocorre devido a um complexo sistema de reconhecimento das partes envolvidas (KAHMANN; BASSE, 2001). Neste caso, alterações na planta ou na diversidade microbiana associada à planta hospedeira poderiam alterar esta interação.

Em cana-de-açúcar os fungos patogênicos são bastante estudados, sendo descritos principalmente: *Colletotrichum falcatum*, agente causal da Podridão Vermelha; *Ustilago*

scitaminea, agente causal do Carvão; *Leptosphaeria sacchari*, agente causal da Mancha Anelar; *Bipolaris sacchari*, agente causal da Mancha Ocular; *Puccinia melanocephala*, agente causal da Ferrugem; *Fusarium moniliforme*, agente causal da "Podridão de Fusarium" e "Pokkah-Boeng" e *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da Podridão do Abacaxi. Neste sentido, têm sido estudados aspectos que visam o controle do patógeno, como o envolvimento de enzimas quitinolíticas na supressão de *Colletotrichum falcatum* (VISWANATHAN; SUNDAR; PREMKUMARI, 2003) e uma melhor classificação taxonômica de fungos, como *Leptosphaeria* (ERIKSSON et al., 2003).

Assim, enquanto alguns fungos são bem conhecidos por causarem diversas doenças em plantas e em determinados casos devastar grandes culturas (JAROSZ; DAVELOS, 1995; THORN, 1997), outros são conhecidos como antagonistas de patógenos de plantas ou decompositores provendo nutrientes para as plantas e estimulando o crescimento vegetal (BRIDGE; SPOONER, 2001; MARTIN; PEROTTO; BONFANTE, 2001; THORN, 1997). As plantas evoluíram para adaptação a diferentes estresses, bióticos e abióticos, existentes no ambiente terrestre, o que permitiu a associação mutualística com os microrganismos (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). Atualmente, acredita-se que todas as espécies de plantas que vivem em ecossistemas naturais estabelecem algum tipo de associação simbiótica com fungos (RODRIGUEZ et al., 2009). Fungos que formam simbioses com plantas podem estar presentes na rizosfera, nas superfícies vegetais (epífitos) e no interior dos tecidos (endófitos). A rizosfera é o solo influenciado pelas raízes das plantas e seus exsudados, e abriga a associação simbiótica fungo-planta mais comum na natureza, as micorrizas, presentes em mais de 90% das plantas terrestres (SELOSSE; TACON, 1998). O termo micorriza é empregado para se referir às associações mutualísticas que ocorrem entre fungos de solo e raízes de plantas, onde a planta se beneficia do fornecimento de água e minerais coletados pelo fungo e, em contrapartida, o fungo recebe carbono derivado da fotossíntese realizada pela planta (SMITH; READ, 1997). Além dos fungos micorrízicos, a rizosfera também abriga outros fungos benéficos às plantas, os quais contribuem de diferentes maneiras, em geral sinergísticas, para a proteção, nutrição e desenvolvimento das mesmas. Já no comensalismo, a associação favorece o fungo sem gerar qualquer efeito benéfico ou prejudicial à planta hospedeira (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001).

Como citado por Schulz e Boyle (2005) e Kogel; Franken e Huckelhoven (2006), as relações fungo-planta compreendem um gradiente de interações (parasitismo-comensalismo-

mutualismo) que depende não somente da adaptação e especificidade a um hospedeiro, mas também do estágio de desenvolvimento das partes envolvidas, da virulência inata do microrganismo, das respostas de defesa da planta e das condições ambientais que permeiam a interação.

Até o momento poucos estudos foram realizados para avaliar a comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar, alguns trabalhos avaliaram a comunidade da rizosfera (ABDEL-RAHIM; BAGHADADI; ABDALLA, 1983; EL AMIN; ABDALLA, 1980; EL-AMIN; SAADABI, 2007; MENDES, 2008). Poucos trabalhos avaliaram os fungos endofíticos associados à cana-de-açúcar, um deles estudou a ocorrência de fungos endofíticos em folhas, hastes e raízes e observou a presença dos seguintes fungos: *F. solani, F. moniliforme, Fusarium* sp*., Curvularia geniculata, P. citrinum, P. italicum, Penicillium* sp*., A. niger, Aspergillus* sp*., M. racemosus, Monilia* sp*., Trichophyton rubrum* e *Trichoderma* sp. (VON MUHLEN; SILVA et al., 2005). Outro trabalho avaliou a população de fungos endofíticos presentes em folhas de cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada (expressando gene de resistência ao herbicida imazapir) por meio dos métodos dependente e independente de cultivo (STUART, 2006; STUART et al., 2010). Os resultados obtidos pelo método dependente de cultivo mostraram que a comunidade de endófitos possui grande diversidade e foi representada por doze famílias diferentes do filo Ascomicota, que incluíram fungos dos gêneros *Ampelomyces, Aspergillus, Cladosporium, Cochliobolus, Epicoccum, Fusarium, Guignardia, Leptosphaeria, Paecilomyces, Pestalotiopsis, Xylaria* entre outros (STUART, 2006; STUART et al., 2010). A análise independente de cultivo com base no gene 18S, identificou a presença de outros gêneros, todos pertencentes ao filo Basidiomicota, como os gêneros *Bullera, Coniothyrium, Cryptococcus, Phoma, Pulvinula, Rhodotorula* e *Ustilago* (STUART, 2006). Esses dados indicaram que os métodos dependente e independente de cultivo tiveram diferentes espectros de amostragem, reforçando a importância de se aliar os dois métodos na avaliação da diversidade de populações microbianas. Romão (2010) avaliou os efeitos da transgênese, estágio de crescimento e manejo agrícola sobre a estrutura e diversidade das comunidades fúngicas da rizosfera e endofítica de raízes de plantas de cana-de-açúcar. Constatou que os efeitos da transgênese, se existentes, devem ser secundários quando comparados às fontes naturais de variação, sendo que, a comunidade fúngica endofítica de raiz mostrou-se muito mais dependente da idade da planta do que da modificação genética presente na variedade transgênica.

2.1.1.2 Fungos endofíticos e suas potencialidades

O termo endofítico foi utilizado por Bary em 1866, e aplicado à flora microbiana interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações antagonísticas ou simbióticas. Carroll (1988) utilizou o termo endófito para organismos que causam colonização assintomática em folhas e ramos de plantas sadias, sendo encontrados frequentemente no interior das plantas. Petrini (1991) propôs uma maior abrangência para o termo endófito, a fim de incluir todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

Azevedo e Araújo (2007) definiram microrganismos endofíticos como 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. Entretanto, Mendes e Azevedo (2007) definiram endofíticos como microrganismos que habitam o interior das plantas hospedeiras e que se distinguem de outro grupo, os patógenos que são capazes de causar doenças em plantas e classificaram em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas às plantas. Essas relações dependem de um gradiente de interações (parasitismo-comensalismo-mutualismo) que depende da adaptação e especificidade a um hospedeiro, do estágio de desenvolvimento das partes envolvidas, da virulência inata do microrganismo, das respostas de defesa da planta e das condições ambientais que permeiam a interação (AZEVEDO et al., 2000; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Rodriguez et al. (2009) propuseram a separação dos fungos endofíticos em diferentes grupos funcionais. Estes autores basearam-se em alguns critérios tais como: padrão de colonização, mecanismo de transmissão entre as gerações do hospedeiro, níveis de biodiversidade *in planta* e função ecológica. Os autores mencionam que a medida que novas associações vão sendo analisadas, a composição dos grupos poderá ser revisada e ampliada. Até o momento, dividiram os fungos endofíticos em quatro grupos, quais sejam: grupo 1 - fungos endofíticos clavicipitáceos, os quais são restritos a algumas espécies de plantas da família Poaceae.

Os grupos 2, 3 e 4 representam fungos endofíticos não clavicipitáceos. Entretanto, os fungos endofíticos do grupo 2 possuem capacidade de conferir benefícios ao *fitness* da planta

adaptados ao habitat. A associação entre *Curvularia protuberata* e plantas de solos termais (*Dichanthelium lanuginosum*) é um exemplo desse grupo. Em experimentos de laboratório e em campo foi observado que nessa associação nem a planta e nem o fungo conseguem sobreviver separadamente em solos com elevada temperatura, mas em associação ambos toleram altas temperaturas (REDMAN et al., 2002; MÁRQUEZ et al., 2007). Porém, quando a associação é submetida a outro tipo de estresse, como, por exemplo, estresse salino ou patógenos, o fungo não protege a planta dos efeitos danosos do estresse (RODRIGUEZ et al., 2009).

Os fungos do grupo 3 são amplamente diversos e encontrados nas partes aéreas das plantas. Sua transmissão é exclusivamente horizontal e a sua função na planta hospedeira é pouco conhecida (RODRIGUEZ et al., 2009). O estudo desse grupo é voltado para a busca de metabólitos ativos, embora existam relatos sobre seu potencial para o biocontrole de patógenos em plantas de clima tropical (ARNOLD et al., 2003).

Os fungos do grupo 4 são conhecidos como DSE (*dark septate endophytes*) e colonizam exclusivamente as raízes das plantas. Apresentam funções relacionadas à promoção de crescimento, proteção contra patógenos e distribuição de plantas em ambientes extremos (MANDYAM; JUNPPONEM, 2005), entretanto, sua função também é pouco compreendida.

O ciclo de vida dos fungos associados às plantas inicia com a germinação do esporo seguido do crescimento da hifa na folha ou superfície de raiz. A penetração de fungos endofíticos na planta pode ocorrer por aberturas naturais do hospedeiro como estômatos (WAGNER; LEWIS, 2000), e também tem sido observado que fungos endofíticos como *Piriformospora indica* podem produzir apressórios durante a penetração nos tecidos da planta hospedeira (VARMA et al., 1999). Entretanto, outros fungos como *Beauveria bassiana* parecem não precisar destas estruturas de penetração para colonizar a planta hospedeira, pois, foi observado que esporos de *B. bassiana* germinam sobre a planta de milho e crescem de forma aleatória nesta superfície, onde posteriormente podem penetrar via estômatos ou por entre as células da epiderme através da cutícula. Nesta penetração, está envolvida a ação de enzimas a partir das hifas de *B. bassiana* sobre a cutícula dos tecidos do hospedeiro (WAGNER; LEWIS, 2000). Segundo os autores, após penetração, o endófito pode se movimentar de forma passiva no interior do hospedeiro, por meio do xilema.

Os microrganismos endofíticos têm sido reconhecidos como sendo de grande importância para a planta hospedeira, pois podem conferir proteção contra insetos herbívoros e patógenos

(AZEVEDO et al. 2000; ARNOLD et al. 2003; NARISAWA et al. 2004; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004). Fungos endofíticos podem conferir resistência à planta contra herbivoria por meio do estímulo direto do vigor da planta ou por meio da produção de metabólitos que aumentam a resistência à herbivoria, podendo estes ser toxinas alcalóides (CLAY et al., 1993). Existe uma associação simbiótica entre a planta hospedeira e o microrganismo endofítico, na qual a planta protege e nutre o microrganismo e este por sua vez induz a síntese ou produz metabólitos bioativos que auxiliam a proteção da planta contra o ataque de fitopatógenos (OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001; ZHANG; SONG; TAN, 2006), podendo ser usado no controle biológico de patógenos. O controle biológico pode ocorrer por meio de diversos modos de ação dos antagonistas, como antibiose, competição por ferro pela produção de sideróforos, competição por sítios de colonização e nutrientes, indução de resistência sistêmica na planta hospedeira, inativação dos fatores de germinação do patógeno, degradação de toxinas do patógeno, parasitismo e produção de enzimas degradadoras da parede celular do patógeno (WHIPPS, 2001).

A tolerância a estresses abióticos, como acidez do solo e estresse hídrico, bem como promoção de crescimento vegetal (ERNST et al. 2003; MALINOWSKI; BELESKY, 2000; MUCCIARELLI et al. 2003; VARMA et al. 1999) também foram relatados como efeito destes microrganismos na planta. Além disso, podem produzir fitormônios (TUDZYNSKI; SHARON, 2002; NASSAR; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2005) e estimular a propagação clonal de gramíneas (CHEPLICK, 2004). O fungo *Neotyphodium* é um endofítico de *Festuca aerundinacea* que beneficia seu hospedeiro aumentando a tolerância à seca (WHITE Jr. et al., 2002), o crescimento da raiz, a produção de sementes, a germinação, a captação de fósforo e a resistência a nematóides e insetos (PANACCIONE et al., 2001). Fungos endofíticos estão relacionados à promoção de crescimento vegetal de algumas espécies pela síntese de fitohormônios, solubilização de fosfato inorgânico, produção de ácido indol acético e fixação de nitrogênio (PEIXOTO-NETO et al., 2002). O basideomiceto *Piriformospora indica*, um endófito de raiz, está associado à capacidade de promover o crescimento vegetal de *Zea mays, Nicotiana tabacum, Petroselinum crispum* L., *A. annua* e *Bacopa monnieri* L., uma vez que a inoculação nessas plantas favorece o aumento de biomassa e consequentemente o crescimento vegetal (VARMA et al., 1999).

Esses organismos podem funcionar como vetores para expressão de genes nas plantas hospedeiras (HAAPALAINEM et al., 1998). E ainda permitem a ocupação de ambientes extremos pelas plantas (REDMAN et al., 2002; MÁRQUEZ et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2008).

Os microrganismos endofíticos estão ainda envolvidos na síntese de novos compostos bioativos com aplicação em diversas áreas como medicina, indústria e agricultura (GUO et al., 2008). Também são envolvidos na produção de compostos de interesse biotecnológico como enzimas (TORRES et al., 2003). Participam na potencialização da capacidade de biorremediação de compostos tóxicos por plantas (DOTY, 2008). Recentemente, foi relatado o papel de bactérias endofíticas na fitorremediação (NEWMAN; REYNOLDS, 2005; ZHUANG et al., 2007). As bactérias endofíticas levam a um aumento da tolerância as moléculas químicas fitotóxicas e aumentam a remoção de poluentes (DOTY, 2008). Germaine et al. (2006) inocularam plantas de ervilha (*Pisum sativum*), com bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* capazes de degradar 2,4-ácido diclorofenoxiacético, mostrando que essas linhagens são capazes de colonizar a planta e apresentar alta capacidade de degradar esse composto. Dessa forma, bactérias e fungos endofíticos podem ser úteis para o aumento da fitorremediação. Enzimas podem ser produzidas por fungos endofíticos, favorecendo a resposta de defesa bioquímica induzida, com a produção de altos níveis de peroxidases, H_2O_2, fenilalanina, amônio liase, como ocorre na colonização da planta com *Cladosporium fulvum* (OSBOURN, 2001).

O potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos têm sido estudado por vários autores (KRECHEL et al., 2002; SESSITSCH et al., 2004; GUO et al, 2008). Considerando a baixa porcentagem das espécies fúngicas conhecidas (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997), pode-se concluir que existe um grande potencial a ser explorado, sugerindo que milhões de espécies fúngicas poderão fornecer importantes biomoléculas. Historicamente, de todos os microrganismos estudados, os actinomicetos e os fungos têm sido os maiores produtores de metabólitos secundários. Sugere-se ainda que os fungos são fundamentais para a saúde e prosperidade de muitos ecossistemas terrestres sendo essenciais para a sustentabilidade e biodiversidade dos mesmos (OWEN; HUNDLEY, 2004).

Fica evidente a grande importância dos fungos endofíticos. Este aspecto, aliado ao fato dos fungos serem uma das maiores fontes de diversidade genética entre os seres vivos, mostram que estudos relacionados a esses organismos tornam-se de suma relevância. Além disso, grande

parte das pesquisas relativas a microrganismos endofíticos foi realizada a partir de plantas de clima temperado. Dessa forma, faltam informações nos aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos para elucidar a interação endófito-planta em clima tropical. Sendo que as plantas tropicais são consideradas grandes reservatórios de microrganismos endofíticos e a conservação, prospecção e uso da diversidade microbiana endofítica depende da conservação dos ecossistemas tropicais (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Alguns pesquisadores têm relatado que um dos maiores desafios dessa área de pesquisa é manusear as comunidades microbianas para favorecer a colonização das plantas por esses microrganismos benéficos (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

2.1.2 O gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* pertence ao filo Ascomycota, ao subfilo Pezizomycotina, à classe Eurotiomycetes, e à ordem Eurotiales, mitospórico Trichocomaceae (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy), sendo a fase teleomórfica pertencente ao gênero *Eupenicillium* ou *Talaromyces*.

Fungos do gênero *Penicillium* são utilizados como organismo modelo em diversos estudos de pesquisa básica. Além disso, diversas pesquisas aplicadas têm mostrado seu enorme potencial, podendo ser utilizado no biocontrole, micoparasitismo, secreção de metabólitos secundários, fonte de novos fármacos para indústria farmacêutica, fonte de enzimas de interesse industrial, entre outros.

Esse gênero de fungo tem sido frequentemente isolado como endofítico em tecidos de diversas plantas. Pesquisas anteriores do nosso grupo mostraram a grande frequência desse gênero habitando internamente tecidos de cana-de-açúcar, assim como a rizosfera (STUART, 2006; MENDES, 2008; FÁVARO, 2009; ROMÃO 2010). Fungos do gênero *Penicillium* foram também isolados como endofíticos de folhas e raízes de *Musa acuminata* (CAO; YOU; ZHOU, 2002). Esse gênero foi o mais frequente no isolamento de fungos endofíticos de folhas, raízes e frutos de *Melia azedarach* (SANTOS et al., 2003). Vega et al. (2008) verificaram a presença de fungos endofíticos em tecidos de café (*Coffea arabica, C. congensis, C. dewevrei* e *C. liberica*), os quais foram caracterizados como sendo do gênero *Penicillium*, apresentando diferentes

espécies: *P. brevicompactum, P. brocae, P. cecidicola, P. citrinum, P. coffeae, P. crustosum, P. janthinellum, P. olsonii, P. oxalicum, P. sclerotiorum* e *P. steckii*.

O fungo *P. pinophilum* é capaz de secretar um metabólito antifúngico, o 3-o-Methylfunicone, para a inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* e outras espécies de fitopatógenos (De STEFANO et al., 1999). *P. frequentans* é um fungo residente da microbiota de ramos e flores de pêssego e pode ser utilizado como produto comercial para biocontrole dos fungos *Monilinia laxa* e *M. fructigena*, causadores da putrefação marrom em pêssego (GUIJARRO et al., 2008). Ma et al. (2008) estudaram um isolado de *P. striatisporum,* da rizosfera de pimenta, em relação ao seu potencial de biocontrole, sendo detectado elevado efeito de antagonismo contra *Phytophthora* spp., *Cladosporium cucumerium* e *Sclerotinia sclerotiorum,* e separação de três substâncias antifúngicas por cromatografia. Mmbaga; Sauvé e Mrema (2008) identificaram microrganismos potenciais para o controle biológico do fungo *Microsphaera pulchra*, causador de doença em *Cornus florida*, uma árvore nativa dos Estados Unidos, encontrando isolados de *Acremonium* spp., *Ampelomyces* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Brachybacterium* spp., *Curtobacterium* spp., *Cryptocoocus* spp., *Rhodosporidium* spp., sendo que os isolados mais efetivos foram capazes de reduzir a incidência da infecção em folhas de 75-100% para menos que 10%.

Sabuquillo et al. (2006) avaliaram o potencial de biocontrole do fungo *P. oxalicum* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causador da murcha do tomateiro, obtendo formulações eficientes em casa de vegetação. Larena et al. (2003) observaram a redução na murcha vascular causada por *Verticillium dahliae* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em casa de vegetação e em condições de campo por indução da resistência em plantas de tomate inoculadas com *P. oxalicum*. Estudos de microscopia revelaram que o fungo *P. oxalicum* é um poderoso micoparasita, que ataca conidiósporos e esporos do fitopatógeno de arroz *Nigrospora oryzae*, penetrando, deformando e destruindo as estruturas reprodutivas (SEMPERE; SANTAMARINA, 2008).

Microrganismos são amplamente explorados como fonte de novos fármacos para a indústria farmacêutica. Nicoletti et al. (2008) avaliaram quinze isolados de *Penicillium* spp. quanto a habilidade de produzir antitumorais baseados na antiproliferação e efeito pro-apoptótico em células tumorosas humanas, mostrando que doze linhagens apresentam potencial para um

estudo mais detalhado, podendo ser utilizadas no futuro para o controle da proliferação de células cancerígenas. Zheng et al. (2005) avaliaram a atividade antibiótica de 24 isolados endofíticos de rizoma de *Polygonum cuspidatum,* uma planta herbácea nativa da Ásia. Os resultados mostraram que três isolados identificados como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mycetia sterillia* foram capazes de produzir substâncias ativas. Xu et al. (2008) mostraram o potencial de isolados endofíticos de rizomas de *Dioscorea zingiberensis*, uma tradicional planta medicinal da China, na produção de compostos antibacterianos. Os isolados foram caracterizados como pertencentes aos gêneros *Nectria, Fusarium, Rhizopycnis, Acremonium* e *Penicillium* spp.

Mandalari et al. (2008) otimizaram a produção de feruloyl esterases e xilanases por *Talaromyces stipitatus* e *Humicola grisea* var. *thermoidea* para a indústria de processamento de alimentos, conseguindo resultados que possibilitam o uso desses fungos para a produção das enzimas em escala comercial.

2.1.3 Transformação genética de fungos como ferramenta em estudos de interação

2.1.3.1 Aspectos básicos da transformação genética de fungos

Os primeiros trabalhos relacionados à transformação genética de fungos iniciaram na década dos anos 70 com a transformação do fungo *Neurospora crasa* (MISHRA; SZABO; TATUM, 1973; MISHRA; TATUM, 1973) e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BEGGS, 1978; HINNEN; HICK; FINK, 1978). Doravante, os trabalhos com transformação genética de fungos passaram a ser crescentes, com relatos da transformação genética de fungos filamentosos, como *Neurospora crassa* (CASE et al., 1979) e *Aspergillus nidulans* (BALLANCE; BUXTON; TURNER, 1983; TILBURN et al., 1983; YELTON; HAMER; TIMBERLAKE, 1984).

O grande desafio da transformação genética em fungos é a passagem do DNA exógeno para o interior da célula, devido à parede celular (OLMEDO-MONFIL; CORTÉS-PENAGOS; HERRERA-ESTRELLA, 2004). Assim, a forma mais convencional é a obtenção de células sem parede, os protoplastos (FINCHAM, 1989). No sistema denominado de protoplasto-PEG, a transferência do DNA exógeno (vetor de transformação) para os protoplastos é feita na presença de íons de cálcio e alta concentração de polietileno glicol (PEG), os quais promovem o agrupamento dos protoplastos e aumentam a permeabilidade da membrana plasmática

(FINCHAM, 1989). Esse sistema foi um dois primeiros a ser usado em fungos filamentosos, e ainda hoje, mesmo após o surgimento de diversos outros métodos, continua sendo amplamente empregado (AMEY et al., 2002; BAEK; KENERLEY, 1998; KERSHAW; TALBOT, 2009; LI et al., 2006; LIMA et al., 2003; SANDHU et al., 2001; ZHANG; YANG; YANG, 2009; ZUCCARO et al., 2009). A eletroporação também é uma técnica de transformação genética utilizada para fungos filamentosos, como podemos observar para os fungos *A. fumigatus* (KWON-CHUNG et al., 1998), *T. longibrachiatum* (SANCHEZ-TORRES et al., 1994) e *B. bassiana* (JIANG; YING; FENG, 2007). Essa técnica substitui o uso de PEG pela indução da permeabilidade reversível das membranas biológicas via exposição a um campo elétrico de alta amplitude por um período de curta duração, onde o pulso elétrico promove mudanças na membrana o que permitem a entrada do vetor de transformação (RUIZ-DÍEZ, 2002).

Entretanto, a obtenção de protoplastos é um processo trabalhoso e exige muitos cuidados, além da limitação para algumas espécies. Dessa forma, metodologias foram desenvolvidas para evitar a necessidade dos protoplastos. O método de transformação por acetato de lítio envolve a exposição de esporos germinando ao vetor de transformação na presença de 0,1 $mol.L^{-1}$ de acetato de lítio, seguida da incubação típica com $CaCl_2$ e PEG. Acredita-se que os cátions de metal alcalino ajudem a passagem do DNA exógeno para o interior das células (FINCHAM, 1989). Outro método para evitar a necessidade do uso de protoplastos é a biolística, desenvolvida para plantas (SANFORD et al., 1987) e estendida para outros organismos. Nesse sistema, o vetor de transformação é transferido para células fúngicas com parede celular intacta por meio da aceleração explosiva (por pressão de hélio e vácuo) de micropartículas (de ouro ou tungstênio) cobertas com DNA (vetor de transformação) contra esporos ou hifas fúngicas. Esse método apresenta a vantagem da possibilidade de transferir DNA exógeno para qualquer célula, tecido ou órgão capaz de se regenerar, superando as limitações de especificidade de hospedeiro. A transformação genética por biolística passou a ser bastante utilizada para fungos filamentosos nos casos em que é difícil obter protoplastos e/ou quando se tratam de fungos difíceis de serem cultivados, como os biotróficos. Diversos fungos foram transformados utilizando-se essa técnica (FUNGARO et al., 1995; GOMES-BARCELLOS et al., 1998; HAZELL et al., 2000; RIACH; KINGHORN, 1996).

Por fim, podemos citar a transformação genética de fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A qual também não necessita de protoplastos e baseia-se na capacidade dessa

bactéria em transferir parte do seu DNA (DNA de transferência, T-DNA) para células eucarióticas (MICHIELSE et al., 2005). Essa metodologia, bastante empregada na transformação genética de plantas (MICHIELSE et al., 2005), foi adaptada para a transformação de fungos, primeiro para a levedura *S. cerevisiae* (BUNDOCK et al., 1995) e depois para fungos filamentosos (DE GROOT et al., 1998).

A maioria dos estudos de Biologia molecular depende do uso de estratégias de transformação genética, portanto, essa é uma etapa essencial da pesquisa moderna dos fungos. Além disso, apresenta grande relevância para o melhoramento de espécies de importância biotecnológica. Em decorrência do exposto, o número de estratégias de transformação genética tem aumentado nos últimos anos, abrindo caminho para análises moleculares mais detalhadas (RUIZ-DÍEZ, 2002). Atualmente as estratégias utilizadas são capazes de realizar tanto a mutagênese insercional aleatória, como também a mutagênese dirigida. A mutagênese dirigida permite a realização da superexpressão de um ou mais genes, ou também o silenciamento gênico, seja ele parcial ou completo (MEYER, 2007). Podemos ainda citar as técnicas baseadas no RNA, as quais são capazes de realizar o silenciamento gênico por meio de regulação pós-transcricional do mRNA (NAKAYASHIKI, 2005). O silenciamento gênico parcial pode ser conseguido com a utilização do RNA antisense e RNA de interferência; já o silenciamento completo é possível utilizando a interrupção do gene em vetores que permitam a recombinação homóloga, via ribozimas e transposons (NAKAYASHIKI, 2005; MUELLER; STAHL; MEYER, 2006).

Não existe regra geral entre as metodologias e as diferentes espécies de fungos. Há necessidade de otimizar cada método para a espécie de fungo estudada, assim como a escolha do método depende do objetivo a ser atingido e da disponibilidade da técnica no local de trabalho.

2.1.3.2 Transformação genética de fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

A metodologia de transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* foi primeiramente utilizada para transferência de genes em plantas e vem sendo muito utilizada nesses organismos (TZFIRA; CITOVSKY, 2006). A *A. tumefaciens*, uma bactéria do solo, aeróbica, Gram-negativa, não formadora de esporos, capaz de induzir a formação de tumores em plantas; passou a ser utilizada também como mediadora da transformação genética de leveduras (BUNDOCK et al., 1995) e fungos filamentosos (DE GROOT et al. 1998).

O gênero *Agrobacterium* é composto por cinco espécies, das quais a *A. tumefaciens* faz parte. Essa bactéria pode infectar plantas, causando a doença denominada galha-da-coroa. A doença é caracterizada pela proliferação descontrolada das células próximas à região do colo da planta, o que resulta na formação de um tecido neoplásico, o tumor (AGRIOS, 1997). A planta ao sofrer a lesão libera moléculas-sinal que atraem a *Agrobacterium,* que infectam as células vegetais. A capacidade de infecção está associada à presença, nas agrobactérias, de um plasmídeo de alto peso molecular (150-250 Kb), denominado plasmídeo Ti (*tumor inducing*). Durante a formação do tumor, o T-DNA é incorporado no núcleo da planta hospedeira a qual passa a produzir hormônios vegetais como auxina, citocinina e opinas, que são compostos sintetizados para a nutrição da bactéria (BORÉM, 1998).

O plasmídeo Ti contém vários genes que mediam a transferência do T-DNA, denominados de genes *vir* e que são essenciais na transferência do T-DNA para o núcleo da célula vegetal. A região *vir* tem cerca de 30 kb e contém pelo menos 10 genes (*vir* A – *vir* J) cujos produtos são vitais para o processamento e transferência do T-DNA (WEI et al., 2006). Para que desencadeie a transferência do T-DNA para o núcleo da planta, a expressão dos genes *vir* deve ser induzida, sendo a acetoseringona (AS) um desses compostos que tem essa propriedade (KADO, 1991). O T-DNA é uma região que contém oncogenes e é flanqueada por duas sequências curtas (aproximadamente 25 pares de bases) denominadas de borda esquerda (LB) e borda direita (RB). As bordas direita e esquerda do T-DNA são necessárias para que ocorra a transferência do mesmo para o núcleo das células vegetais. No entanto, a presença ou não dos outros genes contidos nesta região não interfere no processo de transferência.

Esse sistema natural de transferência de genes de procarioto para eucarioto despertou interesse para estratégias de transferência de genes de interesse do homem às plantas. Posteriormente, a transformação genética mediada por *A. tumefaciens* passou a ser utilizado para a transformação genética de fungos, sendo realizada para diversos fungos, incluindo os filos Ascomicota, Basidiomicota, Zigomicota, Glomeromicota e oomicetos (MICHIELSE et al., 2005; LACROIX et al., 2006).

No entanto, quando o objetivo é a obtenção de fungos com inserção de genes exógenos, os oncogenes presentes no T-DNA são deletados. As linhagens de *Agrobacterium* contendo plasmídios sem a região T, portanto sem oncogenes, são denominadas linhagens desarmadas (LACORTE; MANSUR, 1993). A remoção de todos os genes do T-DNA não inibe a

transferência de DNA pela bactéria, mas evita a formação de tumores. As linhagens de *Agrobacterium* a serem utilizadas na transformação genética devem possuir ainda um segundo vetor, contendo as extremidades do T-DNA (bordas direita e esquerda), entre as quais os genes de interesse são clonados (ROGERS et al., 1986). Esses vetores são denominados de vetores binários e são derivados de plasmídios capazes de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *A. tumefaciens*, e de se manter de forma independente do plasmídio Ti. O vetor deve conter uma região de múltiplos sítios de clonagem entre as extremidades do T-DNA (para a inserção das sequências gênicas desejadas), uma origem de replicação apropriada e um gene para seleção, geralmente, um gene de resistência a um antibiótico.

Michielse et al. (2005) descreve com detalhes o sistema de transferência genética mediada por *Agrobacterium* em fungos. Nos fungos o sistema regulatório é composto por proteínas de virulência VirA e VirG, que são ativadas sob o reconhecimento da acetoseringona. A proteína ChvE interage com VirA na presença de monossacarídeos. VirA sente a presença da acetoseringona e é autofosforilada. Essa fosforização transfere um grupo fosforil para VirG. A ativação de VirG, a qual tem a propriedade de se ligar ao DNA, atua como um ativador transcricional de outros genes localizados nessa região. Para a geração de uma única cópia de DNA do T-DNA são necessários os produtos dos genes VirC e VirD. A transferência do T-DNA da membrana da bactéria é realizada pelo mecanismo de secreção do tipo IV, e proteínas VirD e VirB estão envolvidas nesse processo. VirB forma um poro de transporte e uma estrutura na superfície, chamada de T-pilus. As proteínas VirE2 , VirE3 e VirF são exportadas no sistema de secreção do tipo IV. Essas proteínas protegem contra nucleases e facilitam o transporte até o núcleo. Uma vez o T-DNA no núcleo, este é integrado no genoma do fungo (MICHIELSE et al., 2005). O sistema em fungos apresenta diferenças com o sistema em plantas, os quais sejam: a proteína VirE2 é mais importante em fungos, por exemplo, a não expressão desse gene leva a uma diminuição de 63 para 10% na porcentagem de transformantes de *A. awamori* (MICHIELSE et al., 2004); as plantas produzem proteínas que interagem com proteínas Vir, sendo que isso não ocorre em fungos; plantas produzem inibidores da síntese de purina, o que aumenta a expressão transiente do T-DNA (MICHIELSE et al., 2005). Estes fatores contribuem ainda mais para o sucesso da técnica em fungos.

O fungo *Coniothyrium minitans* tem despertado interesse dos pesquisadores por ser capaz de parasitar o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e ter, portanto, potencial para uso no controle

biológico. Rogers et al. (2004) após transformarem este fungo via *A. tumefaciens* e procederem a análise fenotípica de 1000 transformantes, obtiveram dois mutantes totalmente não patogênicos. Li et al. (2005) utilizaram a metodologia de transformação mediada por *A. tumefaciens* e obtiveram uma biblioteca de trinta mil transformantes de *C. minitans*. A observação de cada um dos transformantes permitiu detectar mutantes com deficiência de esporulação, com deficiência de patogenicidade, com alteração na pigmentação e com deficiência na produção de antibióticos. A análise de sequências do DNA de um dos mutantes para esporulação mostrou que o gene *MAP kinase* foi interrompido pelo T-DNA.

Para o gênero *Penicillium*, três espécies foram transformadas geneticamente mediante *A. tumefaciens.* Sun; Kong e Xu (2002) reportaram a inserção, de forma eficiente, dos genes *vgb* e o gene de resistência a bleomicina para o fungo *P. chrysogenum,* que apresenta grande importância industrial, com auxilio da *A. tumefaciens* LBA4404. O patógeno *P. digitatum,* responsável por infectar frutos de citros pós-colheita, foi transformado via *A. tumefaciens* AGL-1 com o gene *hph*, e os autores concluíram que essa pode ser uma ferramenta útil para geração de mutantes insercionais nesse organismo para estudo de genômica funcional e consequente controle da doença (WANG; LI, 2008). *P. marneffei*, um patógeno humano, foi transformado com duas linhagens de *A. tumefaciens* (LBA4404 e EHA105) e os vetores binários (pCB309A, pBI129A, e pCaMBIA1312A), entretanto a combinação EHA105/pBI129A se mostrou mais eficiente; os resultados mostraram que esta técnica pode ser extremamente importante na geração de mutantes insercionais, visando análise de genética funcional desse importante patógeno humano (ZHANG et al., 2008).

Este procedimento de transformação genética tem mostrado uma série de vantagens, tais como, a não utilização de protoplastos como material inicial, o que otimiza tempo e custos, podendo ser utilizadas células intactas como conídios, micélio vegetativo ou corpos de frutificação (MICHIELSE et al., 2005); não faz uso de equipamentos caros como a biobalística (FRITZGERALD et al., 2003) e apresenta a preferência por integração de uma única cópia no genoma (MICHIELSE et al., 2005). Assim, as vantagens de se utilizar o método baseado em *Agrobacterium* para transformar fungos filamentosos estão relacionadas à eficiência de transformação e simplicidade da metodologia (LIMA, 2005). Alguns trabalhos compararam a eficiência de transformação obtida por este método com a obtida por protoplastos PEG e/ou biobalística, e demonstraram que o sistema *Agrobacterium* permite a obtenção de um maior

número de transformantes (AMEY et al., 2002; CAMPOY et al., 2003; FITZGERALD et al., 2003; RODRÍGUEZ-TOVAR et al., 2005).

Esta metodologia pode tanto ser utilizada para a mutagênese insercional aleatória como também se a região de T-DNA compreender sequências homólogas em relação ao genoma do hospedeiro, a integração pode ocorrer por recombinação homóloga, evidenciando a utilidade da transformação por *Agrobacterium* para mutagênese direcionada ou em experimentos de interrupção de genes (MICHIELSE et al., 2005, LACROIX et al., 2006).

Nos estudos de interação fungo-planta a transformação genética mediada por *A. tumefaciens* pode contribuir para o estudo da biologia da interação entre fungos endofíticos e a planta hospedeira por meio da transferência de genes repórteres e monitoramento da expressão desses genes durante os estágios de colonização do tecido hospedeiro. Os chamados genes repórteres, sob condições apropriadas, promovem uma mudança na coloração de estruturas do fungo, permitindo a visualização fácil de aspectos que se deseja estudar (MULLINS; KANG, 2001). Os sistemas repórteres mais comuns incluem o do GUS (gusA, β-D-glicoronidase de *Escherichia coli*), onde as estruturas/células transformadas adquirem cor azul na presença do substrato da enzima (X-glicuronide) (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987), e da proteína GFP (gene *gfp* da proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*), onde as estruturas/células transformadas emitem fluorescência verde em resposta à exposição à luz ultravioleta ou luz azul (CHALFIE et al., 1994; HASELOFF; DORMAND; BRAND, 1999). A GFP apresenta vantagens no estudo da interação fungo-planta em relação aos demais repórteres, isso devido ao fato da alta estabilidade dessa proteína, a qual necessita apenas de luz UV ou luz azul e oxigênio para emissão de fluorescência, não requerendo co-fatores ou substratos para atividade (LORANG, 2001). O primeiro relato de transformação de um fungo filamentoso expressando GFP foi reportado por Spellig; Bottin e Kahmann (1996), ao quais inseriram esse gene no fitopatógeno *Ustilago maydis* para avaliar a interação com plantas de milho. Doravante vários vetores de expressão contendo diferentes genes promotores e formas variantes da GFP têm sido desenvolvidos.

Em estudos que envolvem a interação fungo-planta, esses sistemas têm sido bastante utilizados para estimar a biomassa fúngica nos tecidos vegetais (HERD et al., 1997; VAN DEN WYMELENBERG et al., 1997), avaliar a expressão de genes em estágios específicos da interação (FEY; COX, 1997; LIU; KOLATTUKUDY, 1999), analisar a atividade metabólica do

fungo *in planta* (HERD et al., 1997; TAN et al., 2001), determinar a localização celular e o transporte dos produtos gênicos durante a infecção fúngica (FEY; COX, 1997; HELBER; REQUENA, 2008; MANNERS, 2000; WEBER et al., 2006) e analisar a dinâmica de crescimento e/ou infecção do fungo nos órgãos do hospedeiro vegetal (ABELLO; KELEMU; GARCÍA, 2008; CHACÓN et al., 2007; CHRISTENSEN et al., 2008; MURRAY; LATCH; SCOTT, 1992; OLIVAIN; ALABOUVETTE, 1999; PLIEGO et al., 2009; SPELLIG; BOTTIN; KAHMANN, 1996; TAN et al., 2001; VAN DEN WYMELENBERG et al., 1997).

Eckert et al. (2005) transformaram com eficiência quatro fungos patogênicos, via *A. tumefaciens,* com os genes *Dsred* (proteína vermelha fluorescente) e *gfp*, para avaliar a colonização e os sintomas das doenças. *Leptosphaeria maculans* e *L. biglobosa* causam doença em cânola e *Oculimacula yallundae* e *O. acuformis* causam doença em cereais, ou seja, as doenças são causadas pela associação de duas espécies, o que dificulta os estudos de interação. Assim, a transformação permitiu um conhecimento molecular da doença com avaliação da interação com a planta. O fungo *T. harzianum*, comumente encontrado como saprófita de solos, foi transformado com um vetor contendo o gene *gfp* sob controle de um promotor constitutivo para avaliar a capacidade de colonizar endofiticamente tecidos das raízes de plantas de tomate (CHACÓN et al., 2007). Fávaro (2009) introduziu o gene *gfp* no fungo endofítico de cana-de-açúcar *Epicoccum nigrum*, por meio de transferência mediada por *A. tumefaciens,* o que possibilitou o estudo da interação com esta planta, mostrando que este fungo coloniza endofiticamente a mesma. Romão (2010) obteve transformantes de *T. virens,* expressando GFP, sendo possível observar que esse fungo não promoveu alterações fenotípicas visíveis em plantas de cana-de-açúcar, colonizou predominantemente as raízes, onde formou camadas densas de micélio ao seu redor, antes de penetrar o espaço intercelular das primeiras camadas de célula da epiderme do tecido radicular.

Desse modo, fica evidente a grande importância da metodologia de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* para fungos. Além disso, os sistemas repórteres nos estudos de interação fungo-planta tem grande potencial para revelar detalhes da relação simbiótica entre esses organismos e com isso fornecer elementos para otimização das relações mutualísticas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material biológico e condições de cultivo

Foram utilizados isolados de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* spp. (Tabela 1), pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos "Professor Dr. João Lúcio de Azevedo" - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Genética, Piracicaba, SP, obtidos em isolamentos de raiz e rizosfera de plantas de cana-de-açúcar.

Durante todos os experimentos os isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (200 g de batata cozida; 18 g de dextrose e 15 g de ágar para 1000 mL de água destilada; pH 6,8; autoclavados a 120°C, 1 atm de pressão, durante 20 min). As placas de Petri foram mantidas a 28ºC por até 7 dias.

2.2.2 Extração e manipulação de DNA genômico

Discos de micélios de cultura de 7 dias crescidas em BDA foram inoculadas em frascos *erlenmeyers* de 250 mL contendo 50 mL de caldo de batata (200 g de batata cozida; 18 g de dextrose para 1000 mL de água destilada; pH 6,8; autoclavados a 120°C, 1 atm de pressão, durante 20 min). Os frascos foram mantidos a 28ºC durante 7 dias.

Após o cultivo o micélio foi filtrado em bomba à vácuo e posteriormente macerado em nitrogênio líquido utilizando cadinho e pistilo de porcelana previamente esterilizados.

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]), incubados por 20 min a 65°C e centrifugado a 16000X g (Centrifuge 5402, Eppendorf) por 10 min a 4°C. O sobrenadante (aproximadamente 800 µL) foi transferido para tudo contendo 1 vol de fenol homogeneizado e centrifugado a 16000X g por 5 min. O sobrenadante foi para transferido para novo tubo contendo 1 vol de fenol:clorofórmio (1:1 vol/vol). O sobrenadante foi transferido para novo tubo com 1 vol de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado a 16000X g. 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 a 16000X g por 15 min e o sobrenadante descartado. O precipitado de

DNA foi lavado com 500 μL de etanol 80% gelado, centrifugado a 16000X g, o etanol foi descartado e o precipitado seco a 37°C. Finalmente, o DNA foi ressuspendido em 50 μL de água ultra-pura autoclavada (Milli-Q). 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 volts.cm^{-1}, e estocado a -20 °C.

2.2.3 Ensaios de antagonismo contra fungos fitopatogênicos

As linhagens fúngicas fitopatogênicas de cana-de-açúcar utilizadas nos ensaios de antagonismo foram: *Ceratocystis paradoxa, Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum.* Estas pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos "Professor Dr. João Lúcio de Azevedo" - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Genética, Piracicaba, SP. Os fungos foram cultivados em meio de cultura BDA (Difco) e mantidos a 28ºC durante 7 dias.

A atividade antagonista contra os fungos fitopatogênicos de cana-de-açúcar foi avaliada pelo método da cultura pareada, a qual consiste no confronto direto, em meio de cultura sólido, do antagonista - no caso fungo endofítico ou da rizosfera - e do fungo fitopatogênico (MARIANO, 1993).

Posteriormente, com o auxílio de um palito previamente esterilizado, esporos de zonas de crescimento ativa das colônias dos endófitos do gênero *Penicillium* foram inoculados na margem de placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura BDA. Em seguida, discos de micélio de 6 mm de diâmetro dos fitopatógenos foram inoculados a uma distância de 5 cm das colônias dos endófitos. Os controles consistiram na inoculação apenas dos patógenos. As placas de Petri foram incubadas por 3 e 5 dias a 28ºC na ausência de luz.

Foram realizadas mensurações do tamanho da zona de inibição entre as colônias pareadas. Dessa forma, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento radial dos patógenos, em relação ao controle.

Para acessar a estabilidade das zonas de inibição, as placas que apresentaram reações de antagonismo foram reavaliadas após 20 dias de cultivo. Os experimentos foram realizados com quatro repetições, em um delineamento inteiramente casualizado.

2.2.4 Secreção de enzimas hidrolíticas em meio de cultura sólido

A utilização de meio sólido para detecção de enzimas em fungos, abordagem sugerida por Hankin e Agnostakis (1975), constituiu o procedimento básico utilizado no presente trabalho. Foram realizados ensaios semiquantitativos em meio de cultura sólido para avaliar a capacidade de secreção, pelos isolados endofíticos e da rizosfera de *Penicillium* spp., das seguintes enzimas: lipase, esterase, protease, amilase, celulase e pectinases (pectina liase e poligalacturonase).

Foram realizados inóculos, com auxílio de palito esterizado, de culturas crescidas em BDA a 28°C durante 7 dias. Os inóculos foram transferidos para o centro de placas de Petri descartáveis (diâmetro 90 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura acrescido de diferentes fontes de carbono.

Para a produção de lipase, foi utilizado meio de cultura contendo peptona (10g); NaCl (5g); $CaCl_2.2H_2O$ (0,1 g); ágar (15 g) em 1000 mL de água destilada (pH 6,0). Para avaliar a atividade da enzima, 10 mL de Tween 20 (Sigma) foram esterilizados separadamente e adicionados ao meio de cultura previamente autoclavado (SIERRA, 1957). A atividade lipolítica foi detectada pelo aparecimento de um precipitado visível, resultante da deposição de cristais de sais de cálcio formados pelos ácidos graxos liberados devido à ação enzimática (GOPINATH; ANBU; HILDA, 2005).

Para a produção de protease foi utilizado meio de cultura Ágar nutriente (Difco). Uma solução de gelatina 8% (Sigma) foi esterilizada separadamente e adicionada ao meio ágar nutriente na proporção de 5 mL para cada 100 mL de meio de cultura. A atividade gelatinolítica foi detectada pela formação de uma zona clara ao redor das colônias, em comparação à opacidade do ágar (GOPINATH; ANBU; HILDA, 2005).

A secreção das enzimas amilase e endoglicanase foi avaliada em meio Mínimo (6 g $NaNO_3$; 0,5 g KCl; 1,5 g KH_2PO_4; 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$; 0,01 g $ZnSO_4$; 0,01 g $FeSO_4$; 15 g de ágar para 1000 mL de água destilada, pH 6,8) (PONTECORVO et al., 1953) sem a adição de glicose e suplementado com 1% de amido solúvel (Sigma) e 1% de carboximetilcelulose (Sigma) como fonte de carbono, respectivamente. A atividade amilolítica foi detectada após a adição de 10 mL de uma solução de iodo (3 g de iodeto de potássio; 1 g de cristal de iodo para 100 mL de água destilada) sobre cada colônia. A formação de uma zona amarelada ao redor da colônia fúngica e o desenvolvimento de coloração azul na superfície restante da placa de Petri indica a ocorrência da

hidrólise do amido. A atividade celulolítica, especificamente a atividade de endoglicanases, foi verificada após a adição de 5 mL de uma solução aquosa de vermelho congo 0,1% sobre cada colônia e incubação das placas em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, a solução de corante foi descartada e as placas de Petri foram descoradas com uma solução de NaCl 4M por alguns minutos. A degradação da carboximetilcelulose ao redor da colônia fúngica apareceu como uma área clara e opaca contra uma coloração vermelha para a carboximetilcelulose não degradada (POINTING, 1999).

A secreção de pectinases foi avaliada em meio de cultura contendo extrato de levedura (1g), pectina cítrica (5g), 500 mL de solução de sais (2 g $(NH_4)_2SO_4$; 4 g KH_2PO_4; 6 g Na_2HPO_4; 0,2 g $FeSO_4$; 1 mg $CaCl_2$; 10 µg H_3BO_3; 10 µg $MnSO_4$; 70 µg $ZnSO_4$; 50 µg $CuSO_4$ 10 µg MoO_3 para cada 1000 mL de água destilada), 500 mL de água destilada e 15 g de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,0, permitindo a detecção de endopoligalacturonase e também para 7,0, permitindo a detecção de pectina liase (HANKIN; AGNOSTAKIS, 1975). A atividade pectinolítica pode ser verificada após a adição de uma solução de brometo hexadeciltrimetilamônia (1%) durante 5 min, o que permitiu a formação de uma zona clara ao redor da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

A produção enzimática foi realizada em triplicata. Foram medidos os diâmetros perpendiculares tanto da colônia quanto do halo de degradação e o índice enzimático foi calculado por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia. Os dados foram submetidos a testes de Tukey a 5% e a 1% de significância, com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

2.2.5 Solubilização de fosfato inorgânico

A solubilização de fosfato inorgânico foi realizada em placas de Petri (GOLDSTEIN, 1986). Os isolados endofíticos e da rizosfera de cana-de-açúcar do gênero *Penicillium* foram inoculados em três meios de cultura diferentes, enriquecidos com fosfato inorgânico $Ca_3(PO_4)_2$: meio de cultura PVK (10 g de glucose; 5 g de $Ca_3(PO_4)_2$; 0,5 g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,2 g de NaCl; 0,1 g de $MgSO_4.7H_2O$; 0.2 g de KCl; 0,5 g de extrato de levedura; 0,002 g de $MnSO_4.H_2O$; e 0,002 g de $FeSO_4.7H_2O$) (PIKOVSKAYA, 1948); meio de cultura NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth midium) (10 g de glucose; 2,5 g de $Ca_3(PO_4)_2$; 0,5 g de $(NH_4)_2SO_4$;

0,2 g de NaCl; 0,1 g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,2 g de KCl,; 0,002 g de $MnSO_4.H_2O$; 0,002 g de $FeSO_4.7H_2O$) (NAUTIYAL, 1999) e meio de cultura Ágar (0,8g de $Ca_3(PO_4)_2$, 10g de glicose, 5g de NH_4Cl, 1g de NaCl, e 1g de $MgSO_4.7H_2O$ (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

Os isolados foram cultivados a 28°C durante 7 dias. A capacidade dos isolados em solubilizar fosfato foi considerada a partir da formação de um halo transparente em torno das colônias. Como controle foi utilizado o fungo *Colletotrichum acutatum.* As análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos a testes de Tukey a 5% e a 1% de significância, com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

2.2.6 Produção de ácido indol acético (AIA)

Os isolados endofíticos e da rizosfera de cana-de-açúcar do gênero *Penicillium* foram cultivados em placa de Petri com meio de cultura Czapek (2 g $NaNO_3$; 1 g de KH_2PO_4; 0,5 g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,5 g de KCl; 0,01 g $FeSO_4.7H_2O$; 30 g de Sucrose; 15 g de ágar para 1000 mL de água destilada; pH 6,5) e mantidos a 28°C durante 7 dias. Posteriormente três discos de micélio de 8 mm de diâmetro foram inoculados em *erlenmayer* de 250 mL, contendo 25 mL do meio de cultura Czapek líquido adicionado de L-triptofano 1 mM. Estes foram mantidos a 28°C durante 4 dias.

Após esse período o micélio foi centrifugado por 5 min a 12000 X g, sendo coletado 1 mL do sobrenadante, adicionado ao mesmo 1 mL do reagente de Salkowski ($FeCl_2$ 27,6 mM e H_2SO_4 6,6 M) e incubado durante 30 minutos no escuro. Em seguida, foram realizadas leituras no Espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultraespec 3000) com um comprimento de onda de 540 nm. As leituras foram normalizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações conhecidas de ácido indol acético comercial. Como controle positivo para produção de AIA foi utilizado o fungo *C. acutatum.* As análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos a testes de Tukey a 5% e a 1% de significância, com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

2.2.7 Transformação genética do fungo endofítico de cana-de-açúcar *Penicillium pinophilum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.7.1 Isolado fúngico

O isolado 44, *Penicillium pinophilum,* foi utilizado para a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, visando a inserção do gene da proteína verde fluorescente (*gfp*).

2.2.7.1.1 Identificação molecular

O DNA do isolado 44 foi extraído de acordo com o item 2.2.2. As regiões ITS1-5,8S-ITS2 e 18S do rDNA foram amplificadas pela técnica de PCR em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 24 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 7 min.

Foram utilizados os iniciadores universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais anelam em posições específicas do 18S e 28S do rDNA e amplificam uma região de aproximadamente 600 pares de bases (WHITE et al., 1990). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo Tampão 1x (50 mM de KCl; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4)); 3,7 mM de MgCl2; 1 mM de dNTP; 0,05U. µ L^{-1} de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 0,4 µM de cada iniciador e 3 ng de DNA. O fragmento amplificado foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 volts.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. Posteriormente os fragmentos amplificados foram purificados com o Kit GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech) e sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo, Brasil.

Para a identificação do isolado fúngico, as sequências foram analisadas comparativamente via BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) contra a base de dados do GenBank no NCBI (National Center For Biotechnology Information), que

utiliza o método heurístico para encontrar o melhor *score* de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados. Dessa forma foram consideradas as sequências que apresentaram os mais altos valores de similaridade.

A árvore filogenética foi construída com base nas regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, obtidas no sequenciamento. Para o alinhamento, edição e construção da árvore foi utilizado o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). O agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Neighbor-Joining* (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor.

2.2.7.1.2 Teste de sensibilidade do isolado 44 a higromicina B

A inibição do crescimento do isolado 44 por higromicina B (Invitrogen) foi determinada antes dos experimentos de agrotransformação. Para a determinação da CIM (concentração inibitória mínima) o isolado fúngico foi inoculado em placas de Petri contendo meio BDA com diferentes concentrações de higromicina B (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu g.mL^{-1}$). Para cada concentração de higromicina B foram avaliadas 4 placas. As placas foram incubadas a 28°C durante 7 dias e então o crescimento do fungo (cm) foi avaliado. O crescimento da linhagem foi monitorado até o momento em que as colônias da placa controle (sem antibiótico) atingiram a extremidade da placa. A concentração de higromicina B que inibiu totalmente o crescimento micelial foi escolhida para os experimentos de agrotransformação.

2.2.7.1.3 Obtenção e preparo dos conídios

Os experimentos de transformação genética foram realizados mediante a germinação dos conídios, o que tornou necessário determinar o tempo no qual os conídios iniciam a germinação em meio líquido. Para isso, 20 mL de caldo de batata (200 g de batata cozida; 18 g de dextrose para 1000 mL de água destilada; pH 6,8; autoclavados a 120°C, 1 atm de pressão, durante 20 min) foram colocados em tubo Falcon de 50 mL contendo $1x10^{-7}$ conídios.mL^{-1}. Esta suspensão foi incubada a 28°C sob agitação constante (100 rpm) e os conídios foram periodicamente monitorados ao microscópio ótico (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas) quanto à emissão de tubo

germinativo. O tempo na qual a maioria dos conídios apresentava tubo germinativo visível foi escolhido para os experimentos de transformação genética.

2.2.7.2 Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*

A linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada na transformação foi a EHA105, a qual foi gentilmente cedida pela Dra. Léia C. de Lima Fávaro (Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil) para a realização dos estudos desse trabalho. A agrobactéria foi estocada em meio Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos rifampicina (100 $\mu g.mL^{-1}$) e espectinomicina (200 $\mu g.mL^{-1}$) para a manutenção do plasmídio Ti desarmado.

2.2.7.3 Vetor de transformação

O vetor binário de transformação de fungos pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003) foi gentilmente cedido à Dra. Léia C. de Lima Fávaro pelo Dr. Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália). Este vetor contém, na região T-DNA, o gene de resistência à higromicina de *E. coli, hph,* dirigido pelo promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *gpd,* de *Glomerella cingulata,* bem como o gene da proteína verde fluorescente, *gfp* (pGreen Lantern, Life Techonologies), dirigido pelo promotor do gene *gpd* de *Aspergillus nidulans* (Figura 1).

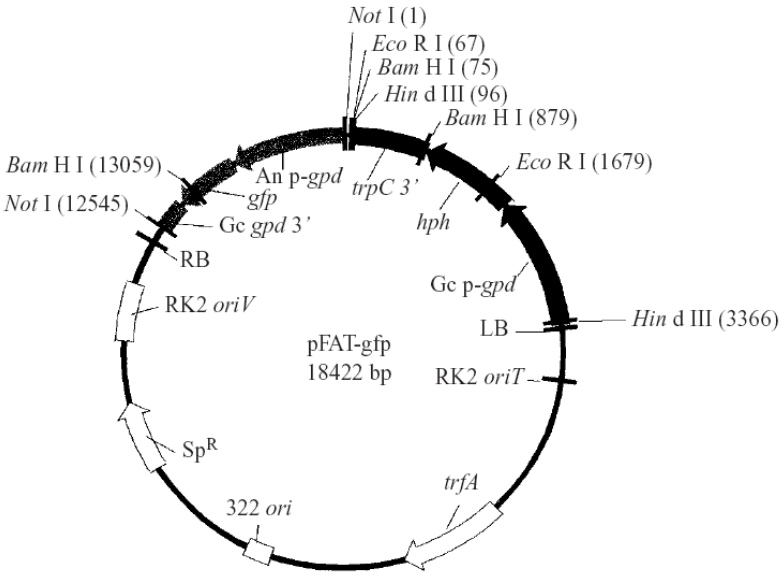

Figura 1 - Mapa do vetor de transformação de fungos mediada por *A. tumefaciens* pFAT-gfp, desenvolvido por Fitzgerald et al. (2003) e gentilmente cedido por Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália). (RB) Borda direita do T-DNA. (LB) Borda esquerda do T-DNA. (*hph*) Gene de resistência à higromicina B de *E. coli.* (*trpC* 3´) Sinal de terminação transcricional do gene *tprC* de *A. nidulans.* (An p-*gpd*) Promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *A. nidulans.* (Gc p-*gpd*) Promotor do gene *gpd* de *G. cingulata.* (Gc *gpd* 3´) Sinal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata.* (Sp^R) Gene de resistência a espectinomicina. (RK2 *oriV*) Origem de replicação vegetativa RK2. (RK2 *oriT*) Origem de transferência RK2. (322 *ori*) Origem de replicação de pBR322. (*trfA*) Gene de replicação de *trfA* de RK2. (*gfp*) Gene da proteína verde fluorescente pGreen Lantern (Life Techonologies). Fonte: Fitzgerald et al. (2003)

2.2.7.4 Otimização do protocolo de transformação

Visando otimizar as condições da transformação genética mediada por *A. tumefaciens* para o fungo *P. pinophilum*, vários parâmetros foram estudados. A metodologia adotada seguiu basicamente o protocolo descrito por De Groot et al. (1998) para fungos filamentosos, com modificações.

Colônias isoladas da linhagem EHA105 de *A. tumefaciens*, crescidas durante três dias em meio de cultura YEP (10 g de extrato de levedura; 10 g de bactopeptona; 5 g de NaCl; 15 g de ágar; 1000 mL de água destilada; pH 7,0), foram transferidas para 20 mL de meio de cultura YEP líquido (10 g de extrato de levedura; 10 g de bactopeptona; 5 g de NaCl; 1000 mL de água destilada; pH 7,0), acrescido dos antibióticos espectinomicina e rifampicina (100 $\mu g.mL^{-1}$). Os frascos foram incubados a 28°C sob agitação (200 rpm) durante 16 horas. Em seguida, a cultura

foi diluída para densidade óptica de 0,15 (OD_{660}) em meio de cultura de indução (10 mM de K_2HPO_4; 10 mM KH_2PO_4; 2,5 mM de NaCl; 2,0 mM de $MgSO_4$; 0,7 mM de $CaCl_2$; 9 µM de $FeSO_4$; 4 mM de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% (v/v) de glicerol; 10 mM de glicose e 40 mM de ácido-2[N-morfolino]-etanossulfônico, esse último foi esterilizado por filtração e adicionado após a autoclavagem do meio de cultura; pH 5,3). O meio de indução foi acrescido de 200 µM de acetoseringona (Fluka), dependendo do tratamento. O controle consistiu de meio de indução sem acetoseringona.

As células foram incubadas a 28°C sob agitação (200 rpm), por um tempo adicional até que a cultura alcançasse densidade óptica de 0,6 (OD_{660}). Nas condições utilizadas este tempo de indução de competência foi de aproximadamente 9 horas. No intervalo de crescimento da cultura bacteriana, conídios da linhagem 44 de *P. pinophilum* com 7 dias de crescimento foram suspensos em água e contados em câmara de *Neubauer*. A suspensão de conídios foi misturada com 30 mL de meio de cultura caldo de batata e incubada a 28ºC sob agitação (100 rpm) para indução da germinação dos esporos. Após 8 horas a suspensão de conídios foi centrifugada a 12000 X g e ressuspensa em meio de indução, a fim de retirar o caldo de batata, e novamente centrifugada 12000 X g e ressuspensa com a suspensão de bactéria induzida para ajustar a concentração a 10^7 conídios.mL^{-1}. Essa mistura foi plaqueada (200 µL) em uma membrana de papel filtro (8 µm de porosidade J. Prolab, Brasil) ou membrana de náilon (0,45 µm de porosidade GE Healthcare) que estavam posicionadas sobre meio de cultura de indução sólido (10 mM de K_2HPO_4; 10 mM KH_2PO_4; 2,5 mM de NaCl; 2,0 mM de $MgSO_4$; 0,7 mM de $CaCl_2$; 9 µM de $FeSO_4$; 4 mM de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% (v/v) de glicerol; 10 mM de glicose e 40 mM de ácido-2[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração e adicionado após a autoclavagem do meio de cultura; 20 g de ágar; pH 5,3). Ao meio de indução sólido foram testadas as concentrações de 200 µM e 400 µM de acetoseringona (Fluka) ou o controle sem acetoseringona. A mistura de células bacterianas e conídios foi cuidadosamente espalhada sobre as membranas com o auxílio de alça de *Drigalski* flambada, de modo que a suspensão não ultrapassasse a borda das membranas. As placas foram incubadas a 25ºC durante 24 e 48 horas na ausência de luz. Após este período, que é denominado tempo de co-cultivo, as membranas foram transferidas para placas contendo meio de cultivo BDA suplementado com 100 µg.mL^{-1} de higromicina B (Invitrogen Life Technologies) e 200 µg.mL^{-1} de cefoxitina sódica (Eurofarma) e incubadas a 28ºC por 7 e 15 dias. A cefoxitina sódica é usada para eliminar a bactéria, e a higromicina B para

selecionar os transformantes. As placas foram avaliadas 7 e 15 dias após a transferência das membranas. As colônias resistentes à higromicina B, foram contadas e repicadas para placas de Petri contendo meio de cultivo seletivo (BDA suplementado com 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B) para posterior purificação e armazenamento.

Dessa forma, os parâmetros avaliados foram: concentração do indutor acetoseringona (200 μM e 400 μM), diferentes tipos de membrana (papel filtro 8 μm de porosidade J. Prolab, Brasil) e náilon (0,45 μm de porosidade, Amershan Hybond N^+, GE Healthcare) e tempo de co-cultivo (24 ou 48 horas).

Para verificar a reprodutibilidade dos resultados, foram realizados três experimentos independentes, ou seja, em tempos diferentes, porém adotando as mesmas condições. Para maior confiança dos dados obtidos, durante cada experimento independente, foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento.

2.2.7.5 Purificação e estoque dos transformantes

A purificação das colônias estocadas foi realizada por meio de diluição em série e semeadura em meio de cultura BDA. Para isso, com o auxílio de alça metálica esterilizada foram coletados esporos e/ou micélios da colônia e transferidos para tubo de 2 mL contento 1 mL de solução salina (8,5 g de NaCl em 1000 mL de água destilada), após, o tubo foi intensamente agitado utilizando-se agitador (Vortex). Posterior à agitação a suspensão foi diluída até 10^{-5} e 10^{-6} e 100 μL dessas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em estufa a 28ºC para o crescimento e obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas foram armazenadas de acordo com o método Castelani (1963), no qual os fungos foram crescidos em meio BDA, e então foram coletados discos de meio de cultura com micélios e colocados em tubos de 2 mL contendo água ultrapura (milliQ) esterilizada. Os frascos foram identificados e armazenados em geladeira.

2.2.7.6 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes

Para estimar a estabilidade mitótica do DNA exógeno no genoma do hospedeiro, 100 transformantes foram escolhidos aleatoriamente e avaliados. Colônias monospóricas dos

transformantes foram crescidas durante 5 dias a 28ºC em meio BDA suplementado com 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B. Os transformantes foram repicados cinco vezes consecutivas em meio de cultura BDA sem a adição do agente seletivo. Após as repicagens sucessivas, conídios provenientes das colônias da última passagem foram semeados em meio de cultura. Fragmentos de micélio provenientes da quinta repicagem em meio não seletivo foram transferidos para placas contendo meio BDA suplementado com 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B e incubados a 28ºC durante 7 dias. Avaliou-se então o número de transformantes que mantiveram o fenótipo higromicina resistente. A porcentagem de transformantes estáveis foi calculada por regra de três simples. Alguns desses transformantes foram analisados ao microscópio de epifluorescência para verificar se a expressão de *gfp* foi mantida após transferências sucessivas na ausência do agente seletivo.

2.2.7.7 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

Por meio de microscopia óptica de fluorescência (MOF), cinco transformantes escolhidos aleatoriamente foram avaliados quanto à expressão do gene *gfp*. Para visualização do micélio foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado de 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B, nas quais foi adicionada uma lamínula de vidro esterilizada. Nas laterais de cada lamínula e adjacente ao meio de cultura, foram inoculados os transformantes, provenientes de culturas crescidas em meio de cultura seletivo. As placas foram incubadas a 28ºC durante 3 dias. Para preparo do material a ser visualizado por MOF, foi adicionado 100 µL de água ultrapura (milliQ) sobre a lâmina, sendo a lamínula colocada sobre a água. Posteriormente foi realizada a vedação com esmalte incolor.

Para a visualização dos conídios os transformantes foram cultivados em caldo de batata e mantidos a 28ºC durante 3 dias. Após esse período alíquotas de 10 µL da suspensão foram colocadas sobre a lâmina e cobertas com uma lamínula. Posteriormente foi realizada a vedação com esmalte incolor.

As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência sob filtro FITC (459-490 nm) e as imagens capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio, com auxílio do software ISIS (Meta System, Alemanha). A linhagem selvagem foi utilizada como controle.

2.2.7.8 Confirmação da transformação genética por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A confirmação da transformação foi realizada por meio da amplificação dos genes da proteína verde fluorescente (*gfp*) e da higromicina (*hph*) presentes na região T-DNA. O DNA genômico de 8 transformantes escolhidos ao acaso foi extraído de acordo com o item 2.2.2. A amplificação do gene *gfp* foi realizada com os iniciadores glGFP5 (5'-GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC-3') e glGFP3 (5'-GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'), que amplificam o fragmento da sequência do gene da proteína verde fluorescente do vetor de transformação pFAT-GFP (FITZGERALD et al., 2003). Já a amplificação do gene *hph* foi realizada com os iniciadores hph1 (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e hph2 (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3') (MALONEK; MEINHARDT, 2001).

As reações foram preparadas para um volume final de 25 μL, com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de $MgCl_2$; Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4)); 0,05 $U.\mu L^{-1}$ de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil) e 0,2 μM de cada iniciador. As amplificações foram realizadas em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 32 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 7 min. Como controle positivo, 20 ng de DNA plasmidial foram utilizados como molde. Os fragmentos amplificados (aproximadamente 750 pb para o gene *gfp* e 600 pb para o gene *hph*) foram observados por eletroforese em gel de agarose 1,2% a 3 $volts.cm^{-1}$, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas Life Sciences, Brasil). Após a eletroforese os géis foram corados em solução de brometo de etídio e fotodocumentados sobre luz UV.

2.2.7.9 Análise de *Southern blot*

O DNA genômico da linhagem selvagem 44 de *P. pinophilum* e dos seus transformantes foram extraídos de acordo com o item 2.2.2.

Com a finalidade de determinar o número de inserções do T-DNA, 10 μg de DNA de 4 transformantes e do isolado original, assim como 2 μg de DNA do vetor pFAT-gfp, foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI (Invitrogen, Life Technologies, Brasil) a 10 $U.\mu L^{-1}$. A

região do T-DNA do vetor pFAT-gfp apresenta dois sítios de reconhecimento para essa endonuclease, ambos localizados no cassete de expressão do gene de resistência à higromicina B (FITZGERALD et al., 2003). Dessa forma, a ausência de sítios de reconhecimento da enzima *Eco*RI no cassete de expressão do gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) implica que a utilização desse gene como sonda na análise de *Southern blot* deve dar origem a uma única banda de 15 kb a partir da digestão do DNA do vetor pFAT-gfp e uma ou mais bandas de tamanhos variados, dependendo do local da inserção e do número de cópias inseridas, a partir da digestão do DNA dos transformantes.

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

2.2.7.9.1 Extração do plasmídio pFAT-gfp

Células de *E. coli* DH5α transformadas com o vetor pFAT-gfp foram inoculadas em meio LB líquido (5 mL) com espectinomicina 200 $\mu g.mL^{-1}$ e incubadas a 37ºC sob agitação (200 rpm) por 12 horas. Em seguida, procedeu-se a extração do plasmídio com uso do kit Mobio (*Ultra Clean 6 minute mini plasmid prep kit*) seguindo as orientações do fabricante. O plasmídio de 18,4 kb foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 $volts.cm^{-1}$. Para quantificação, comparou-se a fluorescência da amostra com a de um padrão conhecido (DNA de fago λ a 12,5; 25; 50; 75; 100 e 200 ng). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado.

2.2.7.9.2 Hibridação molecular

Para a hibridação foi utilizado como sonda um fragmento de DNA contendo o gene *gfp* de 700 pb. Este fragmento foi obtido por PCR com os iniciadores glGFP5 (5'-GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC-3') e glGFP3 (5'-GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'). A marcação da sonda foi realizada segundo o protocolo do kit Gene ImagesTM AlkPhos DirectTM Labelling and Detection System (GE Healthcare).

2.2.7.10 Amplificação, clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA

As regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA foram identificadas por meio da técnica TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction) (LIU; WHITTIER, 1995). Esta metodologia consiste de três reações de PCR sucessivas, utilizando iniciadores "*nested"* específicos para sequências das bordas do T-DNA juntamente com um iniciador arbitrário e degenerado (AD) de sequência curta. A eficiência de amplificação de produtos específicos e não específicos pode ser controlada pela temperatura (COMBIER et al., 2003). Os iniciadores específicos para as sequências das bordas esquerda e direita do T-DNA do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003) foram construídos por Fávaro (2010). Assim, os iniciadores da borda esquerda foram LB1-1 (5'-GTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG-3'),

LB2-2 (5'-CCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTAC-3') e LB3-1 (5'-CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3') e os da borda direita foram RB1-2 (5'-AAGATGGGCAGTCTTTCAGAAGGG-3'), RB2-2 (5'-ATCGCAAAGTGAAGTCTTGCTGCC-3') e RB3-2 (5'-CCAAACGTAAAACGGCTTGTCCCGC-3'). Os iniciadores específicos da borda esquerda utilizados nas reações secundária e terciária (LB2-2 e LB3-1, respectivamente) foram posicionados a uma distância de 105 pb um do outro, para facilitar a confirmação da especificidade do produto por meio de comparação do tamanho das bandas geradas. Os iniciadores específicos para a borda direita do T-DNA (RB2-2 e RB3-2) foram posicionadas a uma distância de 82 pb um do outro.

O DNA genômico foi extraído de acordo com o item 2.2.2 e utilizado como molde nas reações de TAIL-PCR. Os iniciadores arbitrários (AD1, AD2 e AD3) e a composição das reações de PCR foram as mesmas descritas por Liu et al. (1995). A amplificação do TAIL-PCR foi realizada seguindo as condições propostas por Mullins et al. (2001). As reações de amplificação em termociclador PTC - 200 (MJ Research). Para cada transformante, os produtos gerados nas reações primária, secundária e terciária foram analisados lado a lado em um gel de agarose 1,2% a 3 volts.cm^{-1}. Todos os fragmentos obtidos nas reações terciárias que mostraram diminuição do comprimento consistente com a posição dos iniciadores na região T-DNA (em comparação aos produtos da reação secundária) foram considerados como sendo as junções do T-DNA (COMBIER et al., 2003).

Os produtos das reações terciárias foram purificados do gel de agarose, clonados em plasmídio pGEM-T Easy (Promega, Brasil) e transformados em células de *E. coli* DH5α. A amplificação do inserto foi realizada por PCR, utilizando os iniciadores universais M13. As reações foram preparadas em volume final de 50 μL, com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de $MgCl_2$; Tampão 1x (50 mM de KCl; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4)); 0,05 U.μL^{-1} de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil) e 0,2 μM de cada iniciador. A amplificação foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min, após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram purificados (UltraClean^{TM} PCR Clean-Up Kit, MOBIO Laboratories) e sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo, Brasil. Posteriormente, a região correspondente ao

T-DNA foi retirada e as sequências flanqueadoras restantes foram analisadas com auxilio da ferramenta BLAST contra a base de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). As sequências também foram analisadas quanto à presença de ORFs (*Open Reading Frame*) com auxílio da ferramenta ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

2.2.7.11 Interação de *P. pinophilum* e arroz

Com o objetivo de facilitar as análises em plantas de cana-de-açúcar, assim como fazer uma comparação da mesma com outra espécie de planta, foi avaliada a interação de *P. pinophilum* transformado com o gene *gfp* com plântulas de arroz. As sementes de arroz foram gentilmente fornecidas pela Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina (Itajaí, SC) e são da variedade SCS BRS 112. As análises foram realizadas tanto com o isolado selvagem (44), assim como com dois transformantes (P4-gfp e P6-gfp), expressando a proteína verde fluorescente (GFP).

Após remoção da casca da semente de arroz, foi realizada assepsia (1:2:1 – álcool, hipoclorito, álcool) e acondicionamento em frascos com 20 mL de MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Foram colocadas quatro sementes por frasco. Após em período de cinco dias em BOD com fotoperíodo de 12 horas, plântulas foram transferidas para novo frasco (uma plântula por frasco) contendo MS líquido e uma suspensão de conídios com concentração de inóculo para $1x10^7$ conídios.mL^{-1}.

Amostras foram coletadas após 24, 48 e 72 horas. Plantas não inoculadas foram utilizadas como controle. Foram avaliados fragmentos de raízes inteiras, assim como cortes transversais e longitudinais. Para os cortes, fragmentos de raízes foram colocados em isopor e cortadas com lâminas (Gilete). Os materiais foram dispostos diretamente sobre lâminas de vidro contendo 10 μL de água ultrapura (milliQ) esterilizada, as quais foram cobertas com uma lamínula.

Raízes de três plantas foram analisadas para cada tempo de incubação. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência sob filtros FITC (459-490 nm) e Rodamina (546 nm), e as imagens capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio, com auxílio do software ISIS (Meta System, Alemanha).

2.2.7.12 Interação de *P. pinophilum* e cana-de-açúcar

Com o objetivo de avaliar a capacidade de *P. pinophilum* em colonizar endofiticamente os tecidos de cana-de-açúcar, duas abordagens foram utilizadas no presente trabalho: análise de microscopia óptica de fluorescência e reisolamento. As análises foram realizadas tanto com o isolado selvagem (44), como com dois transformantes (P4-gfp e P6-gfp), expressando a proteína verde fluorescente (GFP).

2.2.7.12.1 Análise *in vitro* da interação de transformantes de *P. pinophilum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

As plantas axênicas de cana-de-açúcar utilizadas são da variedade SP80-1842 e foram gentilmente fornecidas pelo CTC (Piracicaba, SP).

Foram inoculados conídios, ajustando-se a concentração de inóculo para $1x10^7$ conídios.mL^{-1}, em frascos de vidro esterilizados contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e uma ponte de papel filtro, de modo que as raízes ficassem imersas no meio líquido contendo os conídios. Plantas não inoculadas foram utilizadas como controle. As plantas foram incubadas em estufa a 28ºC com fotoperíodo de 16 horas. Amostras foram coletadas após 24, 48 e 72 horas. Foram avaliados fragmentos de raízes inteiras, assim como cortes transversais e longitudinais. Para os cortes, fragmentos de raízes foram colocados em isopor e cortadas com lâminas (Gilete). Os materiais foram dispostos diretamente sobre lâminas de vidro contendo 10 μL de água ultrapura (milliQ) esterilizada, as quais foram cobertas com uma lamínula.

Raízes de três plantas foram analisadas para cada tempo de incubação. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência sob filtros FITC (459-490 nm) e Rodamina (546 nm), e as imagens capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio, com auxílio do software ISIS (Meta System, Alemanha).

2.2.7.12.2 Análise *in vitro* da interação de transformantes de *P. pinophilum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por reisolamento

A capacidade de *P. pinophilum* de colonizar raízes de cana-de-açúcar foi avaliada *in vitro.* Para isso, plântulas de cana-de-açúcar da variedade SP80-1842 foram inoculados com uma concentração de inóculo de $1x10^7$ conídios.mL^{-1}, em frascos de vidro esterilizados contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Para o isolamento, superfícies de raízes foram desinfectadas por meio de uma sequência de imersão: etanol 70% por 60 s; hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo acrescido de Tween 20 (1 $mL.L^{-1}$) por 90 s; novamente em etanol 70% por 60 s e duas lavagens em água esterilizada. Após processadas, as raízes foram cortadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 50 mm^2, com auxílio de um estilete sobre placa de Petri, ambos esterilizados. Foram transferidos 7 fragmentos vegetais para cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Difco) acrescido dos antibióticos tetraciclina (50 $\mu g.mL^{-1}$) e penicilina (50 $\mu g.mL^{-1}$), para impedir o crescimento de bactérias. Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo de desinfecção, 100 μL da água utilizada na última lavagem foram semeadas sobre meio BDA (Difco). As placas de isolamento foram incubadas a 28ºC por 24, 48 e 72 horas e acompanhadas periodicamente para avaliação do crescimento de fungos. Após crescimento fúngico, as colônias foram contadas. Foram realizadas três repetições de cada tratamento e os dados foram submetidos a testes de Tukey a 5% de significância, com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Para avaliar o deslocamento do fungo no interior da planta, foi realizado o isolamento de colmos e folhas.

2.2.7.13 Construção de iniciadores

Com a finalidade de encontrar genes relacionados ao processo de interação, iniciadores foram construídos. Para tanto, foi realizada uma pesquisa bibliográfica de genes de fungos relacionados à interação fungo-planta. Posteriormente, foi feita a seleção de ORFs, as quais foram analisadas comparativamente via BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), encontrando homologia em outros fungos.

O alinhamento das ORFs foi realizada pelo programa MEGA 4. A construção e avaliação *in silico* dos iniciadores foi alcançada por meio da ferramenta SciTools OligoAnalyzer 3.1 (www.idtdna.com). Os fatores considerados na construção dos iniciadores foram: sequências de 15 a 25 pb; conteúdo de bases CG mais ou menos igual nos pares; 55 a 65% de GC; preferência por GC na extremidade 3' e a mesma nunca seja degenerada; ter no máximo 4 bases degeneradas; as temperaturas de *melting* devem ser próximas nos pares e não podem se anelar na região 3'.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Material biológico

O material biológico foi composto por 51 isolados de cana-de-açúcar variedade SP80-1842, dos quais 24 são fungos endofíticos de raiz e 27 são fungos da rizosfera (Tabela 1). Estes foram identificados por meio de amplificação e sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA. Os isolados utilizados estão divididos em 8 espécies diferentes (*Eupenicillium reticulisporum, Penicillium janthinellum, P. marneffei, P. minioluteum, P. ochrochloron, P. pinophilum, P. radicum* e *Talaromyces trachyspermus*) (Tabela 1). Entretanto alguns isolados foram apenas classificados em gênero (isolados 27, 104, 205, 246, 292, 69, 140, 146 e 254). A espécie com maior número de isolados é a *P. pinophilum*, representada por 21 isolados, perfazendo um total de 41,18% (Tabela 1).

Fungos do gênero *Penicillium* apresentam grande importância, tanto do ponto de vista de pesquisa básica, como de pesquisa aplicada. Desde os primórdios da Micologia fungos desse gênero são utilizados como organismo modelo em diversos estudos. Além disso, vários estudos de pesquisa aplicada têm mostrado seu enorme potencial, podendo ser utilizado no biocontrole, micoparasita, secreção de metabólitos secundários, fonte de novos fármacos para indústria farmacêutica, fonte de enzimas de interesse industrial, entre outros. Esse gênero de fungo tem sido frequentemente isolado como endofítico em diversos hospedeiros, assim como na rizosfera, em alguns casos, inclusive, como os gêneros mais frequentes. Pesquisas anteriores do nosso grupo mostraram a grande frequência desse gênero habitando internamente tecidos e a rizosfera de cana-de-açúcar (FÁVARO 2009; MENDES, 2008; ROMÃO, 2010; STUART, 2006). No estudo de Cao, You e Zhou (2002) os fungos endofíticos de raízes de bananeiras mais

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

Aliado a importância do gênero *Penicillium*, o interesse no estudo dessa comunidade se deu pelo fato de que no trabalho de Romão (2010) foi possível verificar a predominância do gênero nos experimentos de isolamento de raiz e rizosfera de plantas de cana-de-açúcar. No citado trabalho, o Filo Ascomiceto apresentou 96% de frequência de fungos isolados, o Filo Zigomiceto foi representado por 2,4% e o Filo Basidiomiceto por apenas 1,6%. As classes Eurotiomiceto, Sordariomiceto e Dothideomiceto predominaram dentre os isolados do Filo Ascomiceto, sendo que os gêneros mais frequentes foram *Penicillium, Fusarium, Aspergillus, Chaetomium, Epicoccum* e *Trichoderma*. Entretanto, o fato mais evidente foi a predominância do gênero *Penicillium* (33,3%), que foi observado em todos os tratamentos, tanto em raízes como na rizosfera.

Além disso, a cana-de-açúcar apresenta grande importância para o Brasil. A produção de cana-de-açúcar na safra 2008/2009 no país foi de aproximadamente 570 milhões de toneladas (ANUÁRIO DA CANA, 2009), a qual é destinada para fabricação de açúcar e álcool. O Estado de São Paulo é responsável por 61% da produção dessa cultura (ANUÁRIO DA CANA, 2009).

Tabela 1 - Fungos endofíticos e da rizosfera do gênero *Penicillium* isolados de cana-de-açúcar

Nome dos isolados	Origem dos isolados	Identificação
27	endofítico de raiz	*Penicillium* sp.
38	endofítico de raiz	*Eupenicillium reticulisporum*
44	endofítico de raiz	*Penicillium pinophilum*
46	endofítico de raiz	*Penicillium pinophilum*
49	endofítico de raiz	*Penicillium pinophilum*
72	endofítico de raiz	*Penicillium janthinellum*
74	endofítico de raiz	*Penicillium minioluteum*
89	endofítico de raiz	*Penicillium pinophilum*
104	endofítico de raiz	*Penicillium* sp.
165	endofítico de raiz	*Penicillium marneffei*
166	endofítico de raiz	*Penicillium marneffei*
167	endofítico de raiz	*Talaromyces trachyspermus*
186	endofítico de raiz	*Penicillium radicum*
191	endofítico de raiz	*Penicillium minioluteum*
192	endofítico de raiz	*Penicillium marneffei*
201	endofítico de raiz	*Penicillium pinophilum*
203	endofítico de raiz	*Penicillium pinophilum*
205	endofítico de raiz	*Penicillium* sp.
212	endofítico de raiz	*Penicillium ochrochloron*
246	endofítico de raiz	*Penicillium sp.*
269	endofítico de raiz	*Penicillium pinophilum*
289	endofítico de raiz	*Talaromyces trachyspermus*
292	endofítico de raiz	*Penicillium* sp.
298	endofítico de raiz	*Penicillium pinophilum*
30	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
69	rizosfera	*Penicillium* sp.
85	rizosfera	*Penicillium janthinellum*
127	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
132	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
135	rizosfera	*Penicillium marneffei*
140	rizosfera	*Penicillium* sp.
142	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
143	rizosfera	*Talaromyces trachyspermus*
146	rizosfera	*Penicillium* sp.
148	rizosfera	*Talaromyces trachyspermus*
152	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
154	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
159	rizosfera	*Talaromyces trachyspermus*
162	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
180	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
181	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
214	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
216	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
217	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
218	rizosfera	*Penicillium pinophilum*
254	rizosfera	*Penicillium* sp.
264	rizosfera	*Talaromyces trachyspermus*
265	rizosfera	*Talaromyces trachyspermus*
266	rizosfera	*Talaromyces trachyspermus*
267	rizosfera	*Talaromyces trachyspermus*
282	rizosfera	*Penicillium radicum*

2.3.2 Atividade antifúngica

A capacidade de inibição *in vitro* de diferentes fungos patogênicos, foi avaliada para uma coleção de 51 endofíticos e de rizosfera de cana-de-açúcar do gênero *Penicillium.* Apenas 4 isolados (27, 104, 89 e 205) foram capazes de inibir crescimento do patógeno *Ceratocystis paradoxa*, o que representa apenas 7,84% do total de isolados (Figura 2). Para o fitopatógeno *Colletotrichum acutatum,* dos 51 isolados testados apenas **7** (27, 44, 49, 89, 104, 186 e 205) foram capazes de inibir crescimento desse patógeno (13,72%).

Já para o patógeno de cana-de-açúcar *Fusarium verticillioides* 22 isolados foram capazes de inibir crescimento do mesmo (43,14%) (Tabela 2). Nesse caso, foram observados três tipos de comportamento: 1) as colônias crescem uma em direção a outra, e só cessam o crescimento quando as colônias se tocam, o que foi considerado não antagônico; 2) há sobreposição de uma colônia sobre a outra (Figura 2); 3) as colônias apresentam crescimento inicial, mas em certo ponto a colônia do patógeno cessa o crescimento e apenas o crescimento do endófito foi observado (o patógeno continua crescendo no controle sem o endófito), nesse caso foi considerado como inibição. Para o segundo comportamento, foram avaliadas lâminas coradas no microscópio óptico, a fim de avaliar se a inibição ocorria por parasitismo, entretanto, foi observado um comportamento não antagônico. As inibições foram estáveis mesmo após 20 dias de cultivo, demonstrando que compostos difusíveis foram liberados no meio de cultura pelos fungos endofíticos.

Assim, o fitopatógeno que apresentou maior número de isolados endofíticos antagonistas foi o *Fusarium verticillioides.* Fávaro (2009) observou que 96,42% e 51,78% dos endofíticos do gênero *Epicoccum* produziram zonas de inibição para os fitopatógenos *C. paradoxa* e *F.verticillioides,* respectivamente.

A média de redução do crescimento do patógeno foi de 49,90% para *C. paradoxa,* já para o fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* a média de redução observada pelos isolados foi de 35,80%. Na Tabela 2 podemos observar os valores de redução de crescimento dos isolados para o patógeno *F. verticillioides,* no qual o maior valor de redução foi de 60,10%. Para *Epicoccum,* valores de 72,0% e 62,0% de redução de crescimento foram observados para os fitopatógenos *C. paradoxa* e *F. verticillioides*, respectivamente (FÁVARO, 2009).

Um fato interessante é que todos os isolados capazes de inibir o crescimento dos patógenos *C. paradoxa* e *C. acutatum* são endofíticos de raiz de cana-de-açúcar. Para o fitopatógeno *F. verticillioides* a maioria também é endófito de raiz (17 isolados) e apenas 5 são da rizosfera. Diversos trabalhos demonstram a atividade antifúngica de fungos endofíticos do gênero *Penicillium.* Mmbaga; Sauvé e Mrema (2008) avaliaram o potencial de endofíticos de folhas da árvore nativa de florestas dos Estados Unidos (*Cornus florida* L.) para o controle de oídio, dos 157 isolados avaliados, 14 foram altamente efetivos como agentes de controle biológico em casa de vegetação. As espécies mais eficientes foram identificadas como *Acremonium* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. e *Trichoderma* spp. Fungos endofíticos de raiz berinjela, melão, tomate, morango e repolho foram capazes de controlar, em condições de campo, *Verticillium dahliae* de berinjela. A maioria desses endofíticos faz parte do gênero *Penicillium,* entretanto os mecanismos que coferem essa capacidade são desconhecidos e serão avaliados (NARISAWA et al., 2008). *P. frequentans*, um endofítico de galhos e flores de pêssego, mostrou reduzir *Monilinia laxa* em pomares experimentais (MELGAREJO et al., 1986; De CAL et al., 1990; GUIJARRO et al., 2008) e pós-colheita de podridão parda causada por *M. laxa* e *M. fructigena* em ensaios de laboratório (GUIJARRO et al., 2006, 2007). Sempere e Santamarina (2008) avaliaram *in vitro* a capacidade de fungo *P.m oxalicum*, um endofítico de grãos de milho, em controlar *Nigrospora oryzae*, um fitopatógeno de sementes de arroz, mostrando que este é um poderoso micoparasita.

Determinados isolados avaliados no presente trabalho mostraram efeito antagonista *in vitro* contra os fitopatógenos de cana-de-açúcar estudados. Experimentos em campo podem mostrar a capacidade da comunidade fúngica do gênero *Penicillium,* endofíticos de raiz e rizosfera de cana-de-açúcar, em controlar esses fitopatógenos. Além disso, o conhecimento dos mecanismos que levam a esse antagonismo podem contribuir no aumento da eficiência desses sistemas de controle biológico.

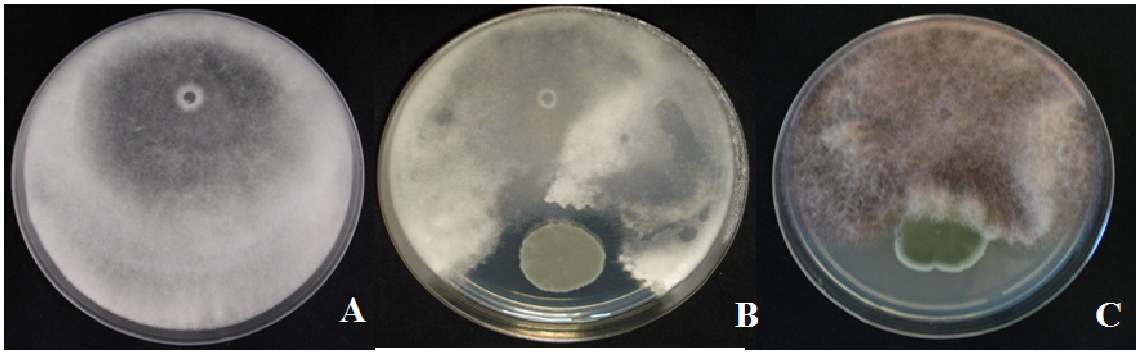

Figura 2 - Ensaio de antagonismo *in vitro.* A) Controle - fitopatógeno *Ceratocystis paradoxa*. B) Linhagem 104, endofítico de raiz de cana-de-açúcar contra o fitopatógeno *C. paradoxa*. C) Sobreposição das colônias do endofítico, isolado 180, e do fitopatógeno *Fusarium verticillioides*

Tabela 2 - Ensaio de antagonismo de isolados endofíticos e da rizosfera de *Penicillium* contra o fitopatógeno *Fusarium verticillioides*

Isolado	Local do isolamento	Redução do crescimento (%)
Controle	-	-
27	endofítico de raiz	60,1
44	endofítico de raiz	60,0
49	endofítico de raiz	60,0
89	endofítico de raiz	60,0
104	endofítico de raiz	59,8
165	endofítico de raiz	59,8
166	endofítico de raiz	58,9
186	endofítico de raiz	58,9
191	endofítico de raiz	58,9
192	endofítico de raiz	58,0
201	endofítico de raiz	58,0
203	endofítico de raiz	58,0
205	endofítico de raiz	58,0
246	endofítico de raiz	58,0
269	endofítico de raiz	57,5
292	endofítico de raiz	57,5
298	endofítico de raiz	57,0
143	rizosfera	57,0
154	rizosfera	56,8
159	rizosfera	56,8
180	rizosfera	56,8
254	rizosfera	56,0

2.3.3 Secreção de enzimas hidrolíticas

A capacidade de produção de zonas de clareamento em meio de cultura sólido é um modo simples e rápido de avaliar a secreção de enzimas por fungos (PATERSON; BRIDGE, 1994; St. LEGER; JOSHI; ROBERTS, 1997). Dessa forma, esse método foi utilizado com a finalidade de realizar um *screening* dos isolados do gênero *Penicillium*, pertencentes à comunidade fúngica de raiz e rizosfera de cana-de-açúcar. Para isso as enzimas lipase, protease, celulase, amilase, pectina liase e poligalaturonase foram avaliadas (Figura 3).

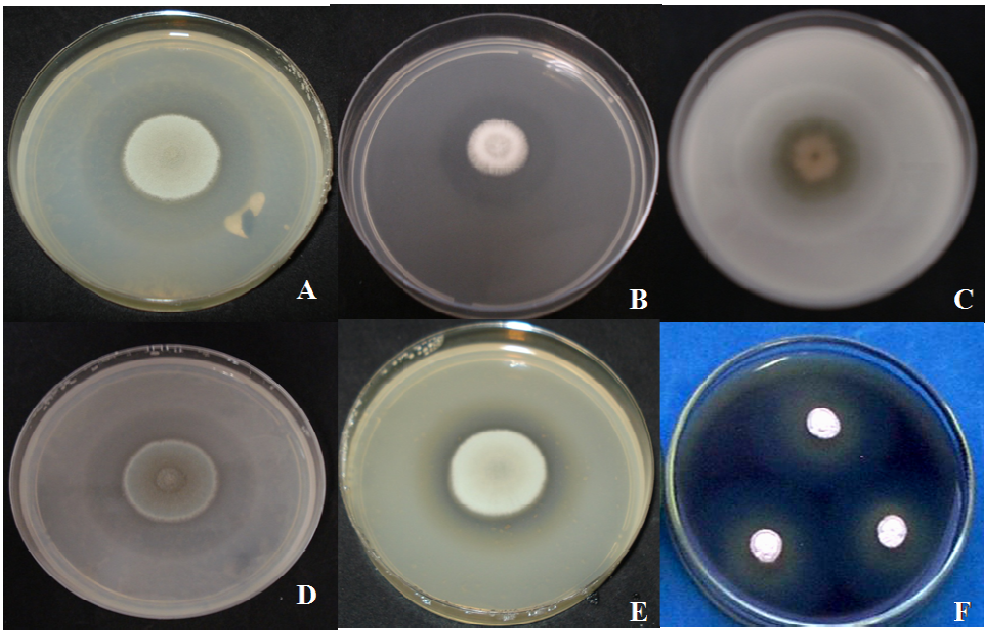

Figura 3 - Secreção de enzimas hidrolíticas. A) Pectina liase. B) Poligalacturonase. C) Lipase. D) Protease. E) Celulase. F) Amilase

Em relação à secreção de lipases, 44 isolados (86,27%) foram capazes de produzir esta enzima (Tabela 3). Os isolados diferem estatisticamente quanto à produção de lipase (Pr > F = 0,0001). Fávaro (2009) avaliou endofíticos de cana-de-acúcar em relação à produção de lipases e constatou que 87,5% das linhagens avaliadas foram capazes de secretar essa enzima. A secreção da lipase não teve correlação quanto ao local de origem dos isolados, endofítico de raiz ou da rizosfera. Como se constatou por meio do teste de Tukey, os dois isolados (162 e 269) que apresentaram superioridade estatística em relação à produção dessa enzima, um é de rizosfera e o outro endófito de raiz, respectivamente (Tabela 3).

Segundo Rollof et al. (1988) a produção de lipases por microrganismos não tem função totalmente conhecida, porém está relacionada com a localização e possibilidade de expansão da infecção em fungos patogênicos Apesar dos isolados avaliados no presente trabalho não serem patogênicos à cultura da cana-de-açúcar, indicando que as lipases, neste caso, não têm função relacionada a patogenicidade, os fungos endofíticos podem utilizar-se desse mecanismo para acessar a planta. A elevada produção de lipases pelos isolados avaliados mostra a capacidade destes fungos de usar lipídeos como fonte de energia e que a epiderme da planta hospedeira pode constituir um nicho preferencial para estas espécies.

Para a enzima protease foi possível verificar que 7 isolados (13,72%) foram capazes de secretar essa enzima (Tabela 4). Silva et al. (2006) avaliou 29 isolados endofíticos de folhas, caules e raízes de plantas de pinha e graviola, de diversos gêneros (*Acremonium, Chaetomium, Colletotrichum, Cylindrocladium, Fusarium, Glomerella, Nigrospora* e *Phomopsis*) e observaram que apenas 5 (17,24%) foram positivos para a atividade proteolítica. Para endofíticos de cana-de-açúcar do gênero *Epicoccum* a produção de protease não foi verificada em nenhuma das linhagens avaliadas (FÁVARO, 2009). Pouco é conhecido sobre o papel das proteases na penetração dos fungos nas plantas (GRIFFIN, 1994), porém, vale ressaltar que as proteases são complexos enzimáticos bastante estudados em fungos e são de grande importância em processos industriais (HANCOCK; MILLAR, 1965). Os principais usos das proteases são na produção biotecnológica de detergents (pepsina) (BAILEY; OLLIS, 1977), indústrias de laticínios como agentes de coagulação de leite (FOX, 1982), agente para amaciamento de carnes (BERNHOLDT, 1975) e aplicação médica, na redução de inflação de tecidos (BAILEY; OLLIS, 1977; NOUT; ROMBOUTS, 1990). Todos os isolados produtores de protease são da espécie *P. pinophilum* e endofíticos de raiz de cana-de-açúcar (Tabela 4), portanto, a característica de produzir essa proteína pode estar associada aos isolados e não ser uma característica relacionada ao processo de interação fungo-planta.

Apesar de alguns fungos endofíticos terem apresentado atividade lipolítica e proteolítica, isto não caracteriza a fitopatogenicidade, pois, segundo Annis e Goodwin (1997), as diferentes isoenzimas de cada grupo de enzimas que degradam a parede celular podem ter diferentes funções, incluindo a obtenção de nutrientes durante o crescimento.

A secreção de amilase foi verificada em 11 isolados (21,57%) do gênero *Penicillium* (Tabela 5). Silva et al. (2006) constataram que os fungos endofíticos de pinha e graviola testados

não produziram as enzimas hidrolíticas extracelulares celulase e amilase. Avaliando o teste de Tukey é possível verificar que o isolado que apresentou maior produção de amilase, tanto a 5% como a 1% de significância, foi o isolado 269, um endófito de raiz de cana-de-açúcar da espécie *P. pinophilum* (Tabela 5). A produção de amilase por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie (GRIFFIN, 1994) e, segundo Dianese (1989), as amilases são comuns em fungos, permitindo a hidrólise do amido até glucose.

Estes resultados reforçam as observações de St. Leger et al. (1997) de que os fungos apresentam adaptação enzimática aos requerimentos de seus nichos ecológicos, por exemplo, espécies fitopatogênicas produzem altos níveis de enzimas degradadoras de polissacarídeos pécticos, celulose e xilana, assim como cutinase, mas secretam baixos níveis de quitinases e protease. Reddy, Lam e Belanger (1996) verificaram a produção de proteases pelo fungo endofítico *Acremonium typhinum* durante a simbiose com *Poa ampla*. Este estudo mostrou que uma serino-proteinase fúngica, At1, semelhante à subtilisina de eucariotos, está presente em altos níveis no apoplasto, constituindo de 1 a 2% das proteínas totais da bainha das folhas. Esta proteinase pode ser um importante fator na interação, facilitando a colonização dos espaços intercelulares por degradar proteínas da parede celular ou do apoplasto, liberando produtos que podem servir como uma fonte nutricional para o fungo.

Quanto à secreção de celulase, especificamente endoglicanase, 41 isolados (80,39%) foram capazes de produzir tal enzima (Tabela 6). Os isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros mostraram atividade celulolítica (FÁVARO, 2009). A função de celulases na interação endofítica não é bem compreendida, no entanto Moy et al. (2002) observaram elevados níveis de uma β-1,6-glicanase fúngica no apoplasto de plantas infectadas, durante a interação entre o fungo *Neotyphodium* sp. e *Poa ampla*, concluindo que esta enzima pode ter uma função nutricional para o fungo, além de estar relacionada aos processos de extensão e ramificação das hifas no interior do apoplasto. Vela et al. (2007) observaram uma relação positiva entre a extensão da penetração epidérmica pelo fungo *Glomus mosseae* e a atividade celulolítica nas raízes. Da mesma forma, a presença de quitinases e proteinases vêm sendo reportada dentro do apoplasto de gramíneas infectadas por fungos endofíticos (REDDY; LAM; BELANGER, 1996; LI et al., 2004).

Tabela 3 - Produção da enzima lipase em meio sólido por isolados de *Penicillium*

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
162 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,651	a	A
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,417	ab	AB
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,288	bc	BC
203 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,267	bcd	BCD
217 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,247	bcde	BCDE
27 (RA)	*Penicillium* sp.	2,232	bcde	BCDE
132 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,000	bcdef	BCDEF
216 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,195	bcdefg	BCDEFG
146 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,146	bcdefgh	BCDEFGH
282 (RZ)	*Penicillium radicum*	2,135	bcdefghi	BCDEFGHI
140 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,133	cdefghi	CDEFGHI
205 (RA)	*Penicillium* sp.	2,100	cdefghi	CDEFGHI
46 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,087	cdefghi	CDEFGHI
186 (RA)	*Penicillium radicum*	2,084	cdefghi	CDEFGHI
191 (RA)	*Penicillium minioluteum*	2,070	cdefghi	CDEFGHI
180 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,068	cdefghi	CDEFGHI
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,052	cdefghi	CDEFGHI
154 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,050	cdefghi	CDEFGHI
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,049	cdefghi	CDEFGHI
167 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	2,048	cdefghi	CDEFGHI
135 (RZ)	*Penicillium marneffei*	2,000	cdefghi	CDEFGHI
165 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,000	cdefghi	CDEFGHI
30 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,000	cdefghi	CDEFGHI
166 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,000	cdefghi	CDEFGHI
289 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	2,000	cdefghi	CDEFGHI
246 (RA)	*Penicillium* sp.	2,000	cdefghi	CDEFGHI
192 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,000	cdefghi	CDEFGHI
218 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,988	defghi	DEFGHI
181 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,985	defghi	DEFGHI
127 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,950	efghijkl	EFGHIJKL
74 (RA)	*Penicillium minioluteum*	1,950	efghijkl	EFGHIJKL
254 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,939	efghijkl	EFGHIJKL
69 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,936	efghijkl	EFGHIJKL
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	1,924	efghijkl	EFGHIJKL
214 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,000	efghijkl	EFGHIJKL
38 (RA)	*Eupenicillium reticulisporum*	2,000	efghijkl	EFGHIJKL
85 (RZ)	*Penicillium janthinellum*	1,911	efghijkl	EFGHIJKL
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	1,911	efghijkl	EFGHIJKL
212 (RA)	*Penicillium ochrochloron*	2,000	efghijkl	EFGHIJKL
143 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	1,846	ijkl	IJKL
142 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,829	jkl	JKL
266 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	1,819	jkl	JKL
152 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,688	kl	KL
148 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	1,633	l	L

Coeficiente de variação = 9,368

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem à razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

Tabela 4 - Produção da enzima protease em meio sólido por isolados de *Penicillium*

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
46 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,205	a	A
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,122	ab	AB
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,000	ab	AB
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,000	ab	AB
203 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,000	ab	AB
27 (RA)	*Penicillium* sp.	2,000	ab	AB
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,000	ab	AB

Coeficiente de variação = 3,765

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem à razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

Tabela 5 - Produção da enzima amilase em meio sólido por isolados de *Penicillium*

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,033	a	A
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,800	b	AB
46 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,767	b	ABC
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,700	bc	BC
203 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,700	bc	BC
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,700	bc	BC
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,667	bc	BC
192 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,500	c	C
165 (RA)	*Penicillium marneffei i*	2,133	d	D
186 (RA)	*Penicillium radicum*	2,133	d	D
246 (RA)	*Penicillium* sp.	2,133	d	D

Coeficiente de variação = 3,106

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem à razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

Tabela 6 - Produção da enzima celulase em meio sólido por isolados de *Penicillium*

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,650	a	A
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,350	ab	AB
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,300	bc	BC
162 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,247	bcd	BCD
216 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,245	bcd	BCD
217 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,195	bcd	BCD
181(RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,000	bcd	BCD
132 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,182	bcd	BCD
203 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,15	bcde	BCDE
146 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,133	bcdef	BCDEF
282 (RZ)	*Penicillium radicum*	2,120	bcdef	BCDEF
205 (RA)	*Penicillium* sp.	2,102	bcdef	BCDEF
140 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,100	bcdef	BCDEF
46 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,083	bcdef	BCDEF
186 (RA)	*Penicillium radicum*	2,068	bcdef	BCDEF
191 (RA)	*Penicillium minioluteum*	2,050	bcdef	BCDEF
180 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,050	bcdef	BCDEF
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,049	bcdef	BCDEF
154(RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,049	bcdef	BCDEF
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,033	bcdef	BCDEF
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,019	bcdef	BCDEF
135 (RZ)	*Penicillium marneffei*	20,17	cdef	CDEF
165 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,000	cdef	CDEF
30 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,000	cdef	CDEF
166 (RA)	*Penicillium marneffei*	1,989	cdef	CDEF
289(RA)	*Talaromyces trachyspermus*	1,975	cdef	CDEF
246 (RA)	*Penicillium* sp.	1,971	cdef	CDEF
142 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,958	cdef	CDEF
218 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,956	cdef	CDEF
167 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	1,956	cdef	CDEF
127 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,954	def	DEF
74 (RA)	*Penicillium minioluteum*	2,000	def	DEF
254 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,952	def	DEF
69 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,952	def	DEF
27 (RA)	*Penicillium* sp.	1,952	def	DEF
214 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,952	def	DEF
38 (RA)	*Eupenicillium reticulisporum*	1,932	ef	EF
85 (RZ)	*Penicillium janthinellum*	2,000	ef	EF
143 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	1,903	ef	EF
212 (RA)	*Penicillium ochrochloron*	1,829	ef	EF
192 (RA)	*Penicillium marneffei*	1,815	f	F

Coeficiente de variação = 8,998

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem à razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

Em relação à atividade da enzima pectina liase, observou-se a produção por 41 isolados (80,39%) (Tabela 7). Para a produção de poligalagturonase 45 isolados (88,23%) foram capazes de secretar essa enzima (Tabela 8). O que se ressalta em relação a essas duas enzimas é que ambas apresentaram elevada produção nos isolados endofíticos e de rizosfera do gênero *Penicillium* avaliados. Outro fato a se destacar é que avaliando os testes de Tukey (Tabelas 7 e 8), é possível destacar que os isolados que apresentaram melhor desempenho em relação a essas enzimas foram isolados endofíticos de raiz de cana-de-açúcar. Os isolados 44 e 49, ambos *P. pinophilum,* apresentaram os maiores níveis de produção dessas enzimas, tanto a 5% como a 1% de significância (Tabelas 7 e 8). Dessa forma, essas enzimas devem estar relacionadas aos processos iniciais de colonização desses fungos na planta.

Mendes (2008) pode ser citado como um dos poucos exemplos de análise molecular da interação entre endófitos e plantas de clima tropical. O autor verificou possíveis diferenças genéticas entre isolados patogênicos e endofíticos de cana-de-açúcar do fungo *Fusarium verticillioides* por meio da análise da expressão gênica de duas endopoligalacturonases (pgI e pgIII). Este trabalho demonstrou que os isolados podem ser diferenciados pelo nível de transcrição do gene *pgIII*, e que esta diferença pode desempenhar importante papel no comportamento endofítico ou patogênico desse fungo na interação com cana-de-açúcar.

Podemos mencionar a grande importância que a análise dos padrões de utilização de substrato por fungos endofíticos apresenta, pois além de evidenciar o potencial biotecnológico destes fungos, pode auxiliar o entendimento das funções destes microrganismos durante a interação. Estudos demonstram que os endófitos são capazes de metabolizar *in vitro* a maioria dos substratos encontrados nas plantas. Durante infecção e colonização da planta os fungos precisam vencer algumas barreiras físicas. Uma das estratégias utilizadas para suplantar essas barreiras consiste na produção de uma série de enzimas extracelulares, como proteases, amilases, fenol oxidases, lipases, lacases, polifenol oxidases, celulases, manases, xilanases e pectina liase (SCHULZ; BOYLE, 2005). A produção dessas enzimas ocorre desde os primeiros estágios de infecção, para degradação de cutina e parede celular, até a efetiva penetração e subsequente diferenciação das hifas dentro do hospedeiro (MENDGEN; DEISING, 1993). Embora a associação entre plantas e fungos endofíticos seja ecologicamente e agronomicamente importante, pouco é conhecido sobre os aspectos fisiológicos da interação. Nesse contexto, as

proteínas secretadas por fungos provavelmente são componentes importantes da interação mutualística, pois estão localizadas na interface das duas espécies (MOY et al., 2002).

Um fato relevante sobre estudos enzimáticos em fungos endofíticos é o envolvimento destes microrganismos na decomposição de material vegetal (PETRINI et al., 1992; MULLER et al., 2001). Por esses fungos estarem presentes nos tecidos senescentes das plantas, eles podem iniciar a decomposição do tecido antes que este seja dominado por espécies saprofíticas. Kumaresan e Suryanarayanan (2002), por meio da análise de fungos endofíticos de folhas de diferentes idades de plantas de manguezal e de sua capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, verificaram que espécies endofíticas de ocorrência relativamente baixa nas folhas vivas são recuperadas com alta frequência após a queda das folhas, reforçando o envolvimento destes fungos na decomposição de material vegetal.

A capacidade dos fungos endofíticos em sintetizar grandes quantidades de metabólitos secundários na planta é o que constitui o principal benefício ecológico para a simbiose e tem sido o principal fator de evolução dessa associação (SCOTT, 2001).

Nesse contexto, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a produção de enzimas hidrolíticas por isolados endofíticos de raiz e rizosfera do gênero *Penicillium* também pode ser importante para a nutrição do fungo durante a interação endofítica com os tecidos de cana-de-açúcar. Além disso, apresentam um grande potencial biotecnológico para uso industrial.

Tabela 7 - Produção da enzima pectina liase em meio sólido por isolados de *Penicillium*

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,677	a	A
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,999	a	A
203 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,175	b	B
205 (RA)	*Penicillium* sp.	3,156	bc	B
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,133	bc	B
246 (RA)	*Penicillium* sp.	3,123	bc	B
186 (RA)	*Penicillium radicum*	3,000	bc	B
46 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,000	bc	B
165 (RA)	*Penicillium marneffei*	3,000	bc	B
191 (RA)	*Penicillium minioluteum*	3,000	bc	B
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,000	bc	B
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,000	bc	B
167 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	3,000	bc	B
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,000	bc	B
289(RA)	*Talaromyces trachyspermus*	3,000	bc	B
74 (RA)	*Penicillium minioluteum*	2,987	bc	B
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,983	bc	B
166 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,978	bc	B
27 (RA)	*Penicillium* sp.	2,968	bc	B
38 (RA)	*Eupenicillium reticulisporum*	2,950	bc	B
212 (RA)	*Penicillium ochrochloron*	2,943	bc	BC
192 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,937	bc	BC
162 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,922	bc	BC
216 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,906	bc	BC
217 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,905	bc	BC
181(RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,000	bc	BC
146 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,885	bc	BCD
282 (RZ)	*Penicillium radicum*	2,878	bc	BCD
140 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,839	bcd	BCD
132 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,783	bcde	BCDEF
180 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,772	bcde	BCDEF
143 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	1,767	bcde	BCDEF
154(RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,755	bcde	BCDEF
142 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,733	bcdef	BCDEF
214 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,733	bcdef	BCDEFG
135 (RZ)	*Penicillium marneffei*	1,600	cdef	BCDEFG
218 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,157	cdefg	CDEFG
254 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,117	cdefg	DEFG
69 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,052	gf	EFG
30 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,050	gf	FG
127 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,000	g	FG

Coeficiente de variação = 10,574

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem à razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

Tabela 8 - Produção da enzima poligalacturonase em meio sólido por isolados de *Penicillium*

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	5,200	a	A
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	5,000	a	A
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,000	b	B
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,000	bc	B
203 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,000	bc	BC
46 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,896	bcd	BC
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,853	bcd	BC
246 (RA)	*Penicillium* sp.	3,853	bcd	BCD
186 (RA)	*Penicillium radicum*	3,816	bcde	BCD
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,737	bcde	BCD
165 (RA)	*Penicillium marneffei*	3,658	bcde	BCD
205 (RA)	*Penicillium* sp.	3,630	bcde	BCD
191 (RA)	*Penicillium minioluteum*	3,605	bcde	BCD
166 (RA)	*Penicillium marneffei*	3,596	bcde	BCD
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,596	bcde	BCD
167 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	3,596	bcde	BCD
27 (RA)	*Penicillium* sp.	3,596	bcde	BCD
289(RA)	*Talaromyces trachyspermus*	3,533	bcde	BCD
74 (RA)	*Penicillium minioluteum*	3,533	bcde	BCD
192 (RA)	*Penicillium marneffei*	3,516	bcde	BCD
38 (RA)	*Eupenicillium reticulisporum*	3,516	bcde	BCD
212 (RA)	*Penicillium ochrochloron*	3,500	bcde	BCD
72 (RA)	*Penicillium janthinellum*	3,500	bcde	BCD
146 (RZ)	*Penicillium* sp.	3,500	bcde	BCD
218 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,500	bcde	BCD
132 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,500	bcde	BCD
265 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	3,500	bcde	BCD
162 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,500	bcde	BCD
216 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,500	bcde	BCD
217 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,483	bcde	BCD
181(RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,475	bcde	BCD
127 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,472	bcde	BCD
282 (RZ)	*Penicillium radicum*	3,467	bcde	BCD
140 (RZ)	*Penicillium* sp.	3,467	bcde	BCD
142 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,460	bcde	BCD
180 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,433	cde	BCD
143 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	3,412	cde	BCD
154(RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,412	cde	BCD
254 (RZ)	*Penicillium* sp.	3,412	cde	BCD
69 (RZ)	*Penicillium* sp.	3,412	cde	BCD
214 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,403	ed	BCD
135 (RZ)	*Penicillium marneffei*	3,396	ed	BCD
159 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	3,391	ed	BCD
264 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	3,333	ed	CD
30 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	3,150	ed	CD

Coeficiente de variação = 6,8144

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem à razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

2.3.4 Solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo é um nutriente que tem papel chave no crescimento vegetal. Sua função além de estrutural e funcional é imprescindível na transferência de energia. A maior parte do fósforo no solo, aproximadamente 95-99%, encontra-se presente na forma de fósforo insolúvel e não pode ser utilizado pelas plantas (PRADHAN; SUKLA, 2005). Os solos brasileiros são carentes em fósforo (BRAGA et al., 1991). Para aumentar a disponibilidade de fósforo para as plantas, um grande número de fertilizante tem sido aplicado no solo. Mas esses fertilizantes, após a aplicação, são rapidamente transformados na forma insolúvel (OMAR, 1998), sobrando uma pequena porcentagem do que é aplicado para as plantas, sendo necessárias contínuas aplicações, o que acarreta em elevados custos (PRADHAN; SUKLA, 2005).

Muitos fungos e bactérias são conhecidos como solubilizadores de fosfato inorgânico (ILLMER; SCHINNER, 1992). Dessa forma, esses microrganismos têm um importante papel na suplementação de fósforo para as plantas, permitindo o uso sustentável dos fertilizantes fosfatados (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007). Alguns trabalhos demonstram que os fungos apresentam maior habilidade para solubilizar fósforo inorgânico que as bactérias (NAHAS, 1996).

No presente trabalho buscou-se avaliar se os isolados do gênero *Penicillium* endofíticos de raiz e rizosfera de cana-de-açúcar são capazes de solubilizar fosfato inorgânico em meio de cultura sólido. Assim, como estudar diferentes meios de cultura em relação à solubilização de fosfato.

A comunidade fúngica avaliada foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico em meio de cultura sólido nos três meios de cultura avaliados (Figura 4, Tabelas 9, 10 e 11). Em relação ao meio de cultura PVK**,** 33 isolados (64,70%) dos 51 avaliados foram capazes de solubilizar fosfato. Os isolados apresentaram diferença estatística significativa no que tange a solubilização de fosfato (Pr > F = 0,0001). Os isolados 44 e 49, ambos *P. pinophilum,* apresentaram maior solubilização de fosfato, inclusive maior que o controle positivo (*Colletotrichum acutatum*), que os demais isolados (Tabela 9). Os dois isolados são endofíticos de raiz de cana-de-açúcar.

Para o meio de cultura NBRIP foi observado que 33 isolados (64,70%) dos 51 avaliados foram capazes de solubilizar fosfato. E estes diferiram estatisticamente quanto a solubilização de fosfato (Pr > F = 0,0001). O isolado 44, *P. pinophilum,* foi superior estatisticamente, tanto a 5%

como a 1% de significância (Tabela 10). Foi observado que os mesmos isolados que foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico em meio PVK também tiveram a mesma capacidade no meio NBRIP.

Contudo, quando foi utilizado o meio de cultura Ágar, 24 isolados (47,06%) dos 51 avaliados foram capazes de solubilizar fosfato. Os isolados diferem estatisticamente em relação a solubilização de fosfato (Pr > F = 0,0001) (Tabela 11). Novamente, os isolados 44 e 49, ambos *P. pinophilum,* apresentaram maior solubilização de fosfato que os demais isolados (Tabela 11).

Os meios de cultura não diferem quanto à solubilização de fosfato (dados não mostrados), ou seja, a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico foi igual nos três meios de cultura avaliados. Esses dados corroboram com Nautiyal (1999), o qual comparou a solubilização de fosfato nos meio PVK e NBRIP para oito linhagens de bactérias, dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus,* e não constatou diferença.

Os efeitos benéficos dos fungos capazes de solubilizar fosfato têm sido demonstrados em diversas culturas com fungos dos gêneros *Aspergillus* (BABANA; ANTOUN, 2006; OMAR, 1998;), *Penicillium* (KUCEY, 1987; REYES et al., 2002) e *Trichoderma* (RUDRESH; SHIVAPRAKASH; PRASAD, 2005; ZAYED; MOTAAL, 2005). WHITELAW (2000) reportou a capacidade de diversas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solubilizar fosfato. PRADHAN e SUKLA (2005) constaram que dois isolados, de rizosfera de arroz, dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* são capazes de solubilizar fosfato em meio de cultura na presença de diversas fontes de carbono e nitrogênio. Mittal et al. (2008) avaliaram seis isolados (dois de *Aspergillus awamori* e quarto de *Penicillium citrinum*) de rizosfera de várias culturas em relação a solubilização de fosfato. Ambos os gêneros de fungos foram bons solubilizadores de fosfato, beneficiando o aumento da biomassa em plantas de grão de bico (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2).

Dessa forma, foi possível constatar que os isolados do gênero *Penicillium,* pertencentes à comunidade fúngica endofítica de raiz e rizosfera de cana-de-açúcar é capaz de solubilizar fosfato inorgânico em meio de cultura sólida. Ensaios de campo podem provar o papel desses microrganismos na potencialização da disponibilidade de fósforo e consequentemente um aumento na produção da cana-de-açúcar.

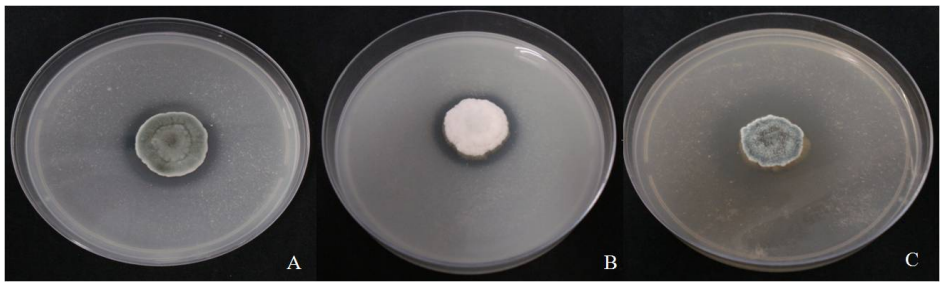

Figura 4 - Solubilização de fosfato inorgânico. A) Isolado 154, *P. pinophilum,* em meio de cultura PVK. B) Isolado 104, *Penicillium* sp. em meio de cultura NBRIP. C) Isolado 44, *P. pinophilum,* em meio de cultura Ágar

Tabela 9 - Teste de Tukey para solubilização de fosfato (meio de cultura PVK)

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,033	a	A
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	3,000	a	A
Controle	*Colletotrichum acutatum*	2,000	b	B
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	1,000	c	C
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	1,200	c	C
27 (RA)	*Penicillium* sp.	1,167	cd	C
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	1,100	cd	C
191 (RA)	*Penicillium minioluteum*	1,100	cd	C
74 (RA)	*Penicillium minioluteum*	1,100	cd	C
72 (RA)	*Penicillium janthinellum*	1,100	cd	C
154 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,067	cd	C
218 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,067	cd	C
180 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,033	cd	C
181 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,033	cd	C
216 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,033	cd	C
282 (RZ)	*Penicillium radicum*	1,033	cd	C
212 (RA)	*Penicillium ochrochloron*	1,033	cd	C
127 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,033	cd	C
167 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	1,033	cd	C
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	1,000	cd	C
146 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,000	cd	C
104 (RA)	*Penicillium* sp.	1,000	cd	C
264 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	1,000	cd	C
38 (RA)	*Eupenicillium reticulisporum*	1,000	cd	C
140 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,000	cd	C
214 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,000	cd	C
192 (RA)	*Penicillium marneffei*	1,000	cd	C
266 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	0,966	cd	C
165 (RA)	*Penicillium marneffei*	0,966	cd	C
30 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	0,966	cd	C
69 (RZ)	*Penicillium* sp.	0,966	cd	C
159 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	0,933	d	C
162 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	0,933	d	C
254 (RZ)	*Penicillium* sp.	0,933	d	C

Coeficiente de variação = 6,595

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem ao halo (mm)

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

Tabela 10 - Teste de Tukey para solubilização de fosfato (meio de cultura NBRIP)

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
Controle	*Colletotrichum acutatum*	4,000	a	A
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,000	ab	AB
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,000	b	B
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,000	c	C
298 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,167	cd	C
27 (RA)	*Penicillium* sp.	2,100	cd	C
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,100	cd	C
191 (RA)	*Penicillium minioluteum*	2,100	cd	C
38 (RA)	*Eupenicillium reticulisporum*	2,100	cd	C
72 (RA)	*Penicillium janthinellum*	2,100	cd	C
154 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,067	cd	C
218 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,033	cd	C
180 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,033	cd	C
181 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,033	cd	C
216 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,033	cd	C
282 (RZ)	*Penicillium radicum*	2,033	cd	C
212 (RA)	*Penicillium ochrochloron*	2,033	cd	C
127(RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,033	cd	C
167 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	2,033	cd	C
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,033	cd	C
146 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,033	cd	C
104 (RA)	*Penicillium* sp.	2,033	cd	C
264 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	2,000	cd	C
74 (RA)	*Penicillium minioluteum*	2,000	cd	C
140 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,000	cd	C
214 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	2,000	cd	C
192 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,000	cd	C
266 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	2,000	cd	C
165 (RA)	*Penicillium marneffei*	2,000	cd	C
254 (RZ)	*Penicillium* sp.	2,000	cd	C
69 (RZ)	*Penicillium* sp.	1,967	d	C
159 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	1,967	d	C
162 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,967	d	C
30 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,967	d	C

Coeficiente de variação = 3,056

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem ao halo (mm)

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

Tabela 11 - Teste de Tukey para solubilização de fosfato (meio de cultura Ágar)

Isolado [(a)]	Identificação	Médias [(b)]	5% [(c)]	1% [(c)]
Controle	*C. acutatum*	4,400	a	A
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,000	ab	AB
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	4,000	b	B
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,000	c	C
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	2,100	c	C
27 (RA)	*Penicillium* sp.	1,167	d	D
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	1,133	d	D
191 (RA)	*Penicillium minioluteum*	1,100	d	D
38 (RA)	*Eupenicillium reticulisporum*	1,100	d	D
72 (RA)	*Penicillium janthinellum*	1,066	d	D
162 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,033	d	D
218 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,033	d	D
180 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,033	d	D
181 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,000	d	D
216 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,000	d	D
282 (RZ)	*Penicillium radicum*	1,000	d	D
212 (RA)	*Penicillium ochrochloron*	1,000	d	D
127 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	1,000	d	D
167 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	1,967	d	D
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	1,000	d	D
146 (RZ)	*Penicillium* sp.	0,900	d	D
104 (RA)	*Penicillium* sp.	0,900	d	D
264 (RZ)	*Talaromyces trachyspermus*	0,900	d	D
154 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	0,800	e	E
140 (RZ)	*Penicillium* sp.	0,800	e	E

Coeficiente de variação = 3,767

[(a)] RA representa fungos endofíticos de raiz e RZ representa fungos da rizosfera

[(b)] As médias correspondem ao halo (mm)

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

2.3.5 Produção de ácido indol acético (AIA)

As auxinas são uma classe de fitohormônios capazes de afetar o crescimento vegetal, e, podem ser produzidas por plantas (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1998), bactérias (BAREA et al., 1976) e fungos (DVORNIKOVA; SKRIABIN; SUVOROV, 1970). Dos vários tipos de auxinas existentes, o ácido indol acético é uma delas.

No presente trabalho buscou-se avaliar se isolados do gênero *Penicillium,* endofíticos de raiz e rizosfera de cana-de-açúcar, são capazes de produzir ácido indol acético. Para isso 19 isolados foram testados, os quais foram escolhidos por apresentaram melhores desempenhos em relação à solubilização de fosfato. Dessa forma, foi possível constatar que todos os isolados avaliados foram capazes de produzir AIA (Tabela 12), e ainda os mesmos diferem estatisticamente quanto a produção desse fitohormônio (Pr > F = 0,0001). O isolado 44 apresentou maior produção de AIA em relação aos demais isolados avaliados, tanto a 5% quanto a 1% de significância (Tabela 12). Foi possível constatar que embora os dois isolados mais produtivos sejam endofíticos de raiz, os isolados de rizosfera apresentaram melhor desempenho (Tabela 12). Esta característica pode estar associada à promoção de crescimento vegetal, pois tendo em vista que esse fitohormônio aparentemente não funciona como um hormônio em células fúngicas, esta habilidade pode ter evoluído devido sua importância na interação fungo-planta. Microrganismos que habitam a rizosfera de diversas plantas são capazes de sintetizar e liberar auxinas como metabólitos secundários devido aos ricos fornecimentos de substrato exudado pelas raízes em comparação com solos não rizosféricos. Em nosso estudo foi utilizado triptofano na produção de AIA. Khalid et al. (2004) e Shaharoona; Arshad e Zahir (2006), reportaram a produção de AIA na presença e ausência de triptofano, sendo a produção aumentada com a adição de triptofano.

Auxinas são produzidas por um grande número de fungos ectomicorrízicos (EK; LJUNGQUIST; STENSTRÖM, 1983; GAY; DEBAUD, 1987). Nassar; El-Tarabily e Sivasithamparam (2005) demonstraram pela primeira vez o potencial de uma levedura endofítica de raiz de milho, *Williopsis saturnus*, em promover o crescimento vegetal, este fato foi relacionado à produção de ácido indol acético e ácido indol pirúvico por essas leveduras. Mittal, et al. (2008) avaliaram seis isolados (dois de *Aspergillus awamori* e quarto de *Penicillium citrinum*) de rizosfera de várias culturas em relação a produção de AIA. Ambos os gêneros de fungos foram capazes de produzir AIA, e consequentemente promover o crescimento vegetal em plantas de grão de bico (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2).

Os isolados avaliados foram bastante eficientes em relação à produção de AIA, como pode ser verificado principalmente nos isolados 44, 49 e 282 (Tabela 12). Sendo importante salientar que os isolados 44 e 49, ambos *P. pinophilum,* foram também bons solubilizadores de

fosfato. Dessa forma, os mesmos podem apresentar habilidade em auxiliar na promoção do crescimento vegetal em condições de campo.

Tabela 12 - Teste de Tukey para produção de ácido indol acético ($\mu g.mL^{-1}$)

Isolado[(a)]	Identificação	Médias[(b)]	5%[(b)]	1%[(c)]
Controle	*Colletotrichum acutatum*	240,110	a	A
44 (RA)	*Penicillium pinophilum*	200,885	b	B
49 (RA)	*Penicillium pinophilum*	160,216	c	C
282 (RZ)	*Penicillium radicum*	120,338	d	D
218 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	90,983	e	E
180 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	90,426	f	F
181 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	80,000	g	G
162 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	70,790	g	G
127 (RZ)	*Penicillium pinophilum*	60,823	h	H
269 (RA)	*Penicillium pinophilum*	60,000	h	HI
191 (RA)	*Penicillium minioluteum*	60,428	hi	HIJ
38 (RA)	*Eupenicillium reticulisporum*	60,018	ij	IJK
72 (RA)	*Penicillium janthinellum*	60,018	ij	IJK
27 (RA)	*Penicillium* sp.	60,000	j	IJK
89 (RA)	*Penicillium pinophilum*	50,944	j	IJK
298 (RA)	*Penicillium pinophilum*	50,894	j	JK
216 (RA)	*Penicillium pinophilum*	50,832	j	K
212 (RA)	*Penicillium ochrochloron*	50,717	jk	KL
167 (RA)	*Talaromyces trachyspermus*	50,324	k	L
201 (RA)	*Penicillium pinophilum*	40,828	l	M

CV = 1,509

[(a)] RA significa endofítico de raiz e RZ de rizosfera

[(b)] As médias correspondem $\mu g.mL^{-1}$

[(c)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

2.3.6 Transformação genética do fungo endofítico de raiz de cana-de-açúcar *Penicillium pinophilum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

2.3.6.1 Identificação molecular

A linhagem 44, isolada como endófito de raiz de cana-de-açúcar, foi identificada a partir da comparação da sequência de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA com banco de dados do GenBank via BLASTn. Considerando os mais altos valores de identidade e a similaridade entre as sequências foi possível verificar que a linhagem 44 pode ser classificada como *Penicillium pinophilum*. A árvore filogenética foi construída para a sequência da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA da linhagem 44 (Figura 5), adotando sequências do GenBank como base para comparação.

Esse isolado foi escolhido para a transformação genética em questão por apresentar capacidade de inibição de crescimento dos fitopatógenos *C. acutatum* e *F. verticillioides*, apresentar secreção das enzimas lipase e amilase. Além disso, foi estatisticamente superior aos demais isolados avaliados em relação à secreção de celulase, pectina liase e poligalacturonase, tanto a 5% como a 1% de significância. Também foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico nos três meios de cultura avaliados, também com superioridade estatística. E foi o isolado que apresentou maior produção de ácido indol acético. Além disso, esse isolado pertence à espécie *P. pinophilum*, a qual foi a mais frequente na comunidade fúngica estudada. Assim, o presente estudo descreve pela primeira vez a transformação de *P. pinophilum* pelo sistema *Agrobacterium*.

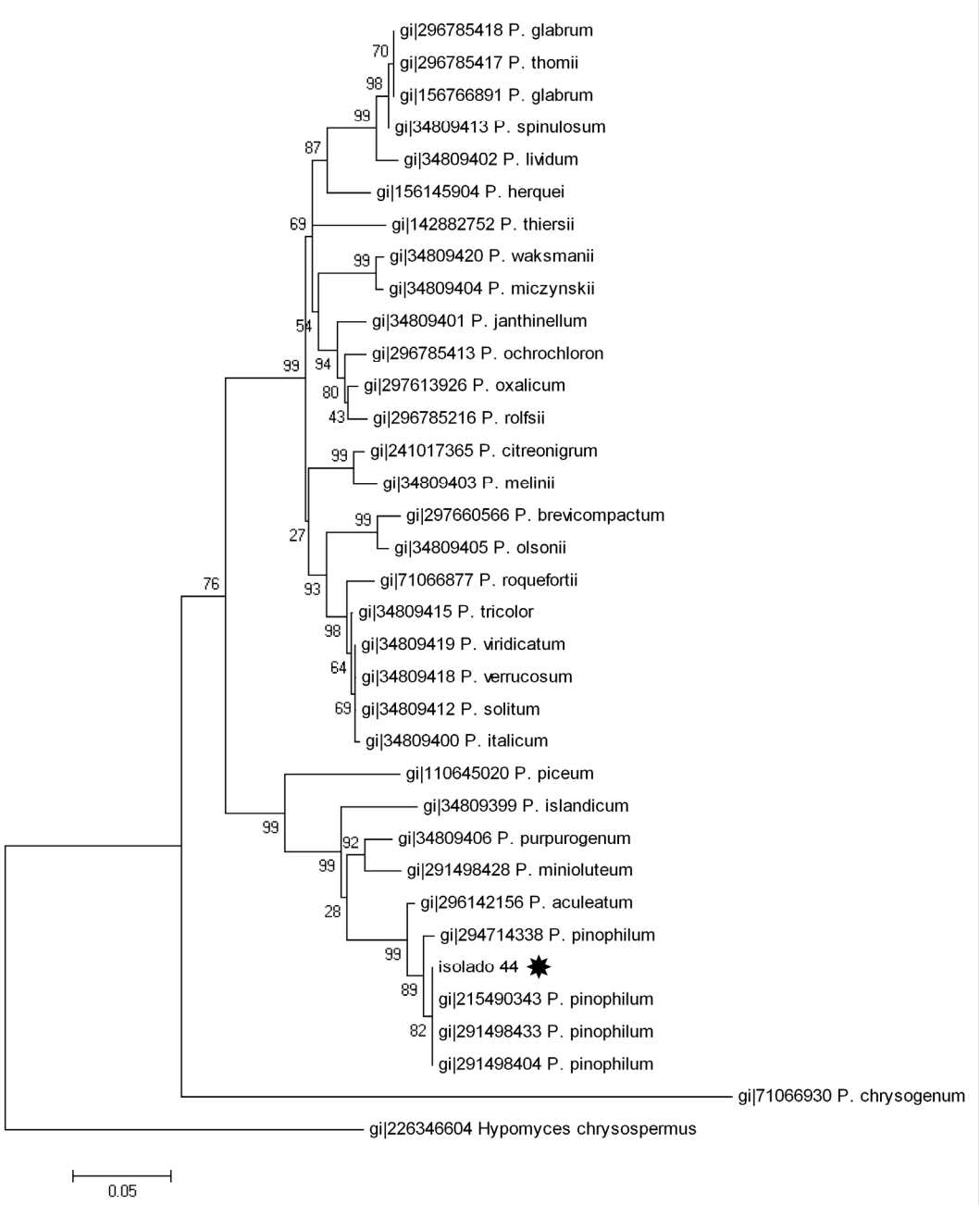

Figura 5 - Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA da linhagem 44. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre as espécies. Como grupo externo foi utilizado *Hypomyces chrysospermus*. Valores de bootstrap (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,05 substituições por posição

2.3.6.2 Sensibilidade a higromicina B

A higromicina B é um antibiótico aminoglicosídico que inibe a síntese de proteínas em procariotos e eucariotos interferindo na translocação dos ribossomos e causando erro na leitura da fita de RNAm. Genes que conferem resistência a esse antibiótico foram isolados e caracterizados a partir de linhagens de *Streptomyces hygroscopicus* (ZALACAIN et al., 1986) e *Escherichia coli* (GRITZ; DAVIES, 1983; KASTER et al., 1983). Ambos codificam para uma fosfotransferase que inativa o antibiótico por meio de fosforilação (GRITZ; DAVIES, 1983). Vetores de clonagem contendo o gene de resistência à higromicina B, *hph* de *E.coli*, foram desenvolvidos para uma série de organismos, inclusive para fungos filamentosos (QUEENER et al. 1985).

Com o objetivo de desenvolver um protocolo eficiente de transformação para o fungo endofítico de raiz de cana-de-açúcar *P. pinophilum*, o presente trabalho estudou a capacidade da *A. tumefaciens*, linhagem EHA 105, em transferir a região T-DNA para este fungo, utilizando o gene de resistência à higromicina (*hph*) como marcador de seleção e o gene *gfp* (proteína verde fluorescente) como repórter. A sensibilidade da linhagem receptora ao antibiótico higromicina B é um pré-requisito para o uso do gene *hph* como marcador de seleção. Dessa forma, a concentração mínima inibitória (CMI) de higromicina B foi determinada para a linhagem 44, utilizando diferentes concentrações do antibiótico (Figura 6).

Dentre as concentrações de higromicina B avaliadas, foi possível observar que a concentração de 50 $\mu g.mL^{-1}$ foi capaz de inibir totalmente o crescimento da linhagem 44 (Figura 6). Entretanto, para aumentar a confiabilidade dos resultados, a concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B foi adotada para a seleção dos transformantes.

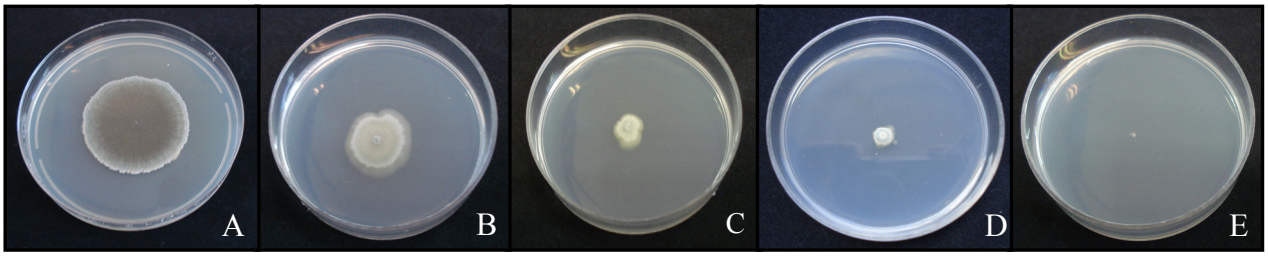

Figura 6 - Colônias de *P. pinophilum* linhagem 44 cultivadas em meio de cultura BDA contendo diferentes concentrações do antibiótico higromicina B. A) Controle, linhagem crescida em meio de cultura sem antibiótico. B) 6,25 $\mu g.mL^{-1}$. C) 12,5 $\mu g.mL^{-1}$. D) 25 $\mu g.mL^{-1}$. E) 50 $\mu g.mL^{-1}$

2.3.6.3 Transformação genética de *P. pinophilum* mediada por *A tumefaciens*

A pré-germinação de conídios é utilizada com frequência antes do co-cultivo na transformação mediada por *A. tumefaciens* visando aumentar a eficiência de alguns sistemas de transformação, devido ao aumento das chances de infecção das hifas em desenvolvimento (O´CONNEL et al., 2004). Em um primeiro momento, testou-se a transformação de *P. pinophilum* com conídios não germinados, não obtendo resultado satisfatório (dados não mostrados). Dessa forma, os experimentos subsequentes foram realizados com conídios germinados como material inicial para a transformação genética em questão. Avaliando os tempos de germinação do fungo *P. pinophilum* foi possível constatar que com 8 horas de incubação a maioria dos conídios apresentou tubo germinativo, sendo este o tempo utilizado nos experimentos de transformação.

A partir da utilização de conídios germinados foi possível a obtenção de colônias resistentes a higromicina B e expressando proteína verde fluorescente (GFP), após 7 e 15 dias de de crescimento em meio de cultura seletivo (Figura 7). Os transformantes resultantes foram nomeados da seguinte maneira: P-número do transformante e a palavra gfp (exemplo: P-1gfp, P-2gfp). O estudo da interação entre fungos e plantas tem sido facilitada pela introdução de genes repórteres, como o gene da β-D-glicoronidase e *gus*A de *E. coli* e o gene *gfp* da água viva *Aequorea victoria* (LARRAINZAR; O´GARA; MORRISSEY, 2005; MIKKELSEN et al., 2003). A GFP apresenta vantagens no estudo da interação fungo-planta em relação aos demais repórteres, isso devido ao fato da alta estabilidade dessa proteína, a qual necessita apenas de luz UV ou luz azul e oxigênio para emissão de fluorescência, não requerendo co-fatores ou substratos para atividade (LORANG, 2001).

O acetoseringona é um composto fenólico essencial para a transferência do T-DNA, porque funciona como indutor da expressão de genes de virulência (*vir*) (GELVIN, 2003), o que tem sido provado em diversos trabalhos de transformação de fungos (MICHIELSE et al., 2005). Os transformantes obtidos no presente trabalho tiveram a presença de acetoseringona tanto no meio de cultura de crescimento das bactérias, como no meio de cultura durante o co-cultivo. No controle, sem a presença de acetoseringona, não foi possível a recuperação de nenhum transformante (Figura 7).

Utilizando a linhagem EHA 105 de *A. tumefaciens* como doadora, o número médio de colônias transformadas (resistentes a higromicina B) variou de 13 colônias por 10^7 conídios (condição de 400 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de papel filtro e 24 horas de co-cultivo) a 482 colônias por 10^7 conídios (condição de 200 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de náilon e 48 horas de co-cultivo), nos três experimentos independentes (Figura 7). A eficiência de transformação foi superior a apresentada em outros trabalhos de agrotransformação com fungos do gênero *Penicillium.* A eficiência de agrotransformação de *Leptosphaeria maculans* e *L. biglobosa* foi 30-40 e 20-25 transformantes por 10^7 esporos, respectivamente (ECKERT et al., 2005). Wang e Li (2008) obtiveram uma eficiência de transformação de 60 transformantes por 10^6 conídios de *P. digitatum.* Romão (2010) obteve uma eficiência média de transformação de 11,5 transformantes por 10^7 conídios para *Trichoderma virens*. Sugui, Chang e Kwon-Chung (2005) reportaram a eficiência de agrotransformação de aproximadamente 100 transformantes por 10^7 conídios de *Aspergillus fumigatus.*

2.3.6.4 Efeito dos diferentes parâmetros sobre a eficiência da transformação

A eficiência de um sistema de transformação genética é dependente de vários parâmetros, dentre eles podemos citar: linhagem de *A. tumefaciens* doadora, tipo de material fúngico inicial, concentração do indutor acetoseringona, tipos de membrana, tempo de co-cultivo entre bactéria e fungo (MICHIELSE et al., 2005).

A linhagem de *A. tumefaciens* utilizada no trabalho foi a EHA105. Esta linhagem deriva da linhagem EHA101, que contém plasmídio indutor de tumor hipervirulento pTiBo542A, do qual a região T-DNA foi deletada e substituída pelo gene de resistência à canamicina (HOOD et al., 1986). A deleção desse loco resultou no plasmídio pTiEHA105 (HOOD et al., 1993), o qual contém os genes *vir* hipervirulentos do tipo succinamopina. Fávaro (2009) avaliou a eficiência da transformação genética do fungo endofítico *Epicoccum nigrum* mediada por duas linhagens de *A. tumefaciens* (EHA105 e LBA4404). A linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* apresentou uma eficiência significativamente superior à linhagem LBA4404, sendo que no primeiro sistema foi possível a obtenção de até 96 transformantes para 10^5 conídios para uma média de 5 placas em determinada combinação de parâmetros, já para a linhagem LBA4404 nessas mesmas condições foi possível a obtenção de 4,6 transformantes. Aliado a esse fato, um experimento preliminar

utilizando a linhagem LBA4404 foi avaliado para a transformação genética de *P. pinophilum* (dados não mostrados), sendo que o mesmo mostrou baixa eficiência. Diante do exposto a linhagem EHA105 foi estabelecida como um fator invariável no sistema de transformação estudado no presente trabalho e apresentou elevada eficiência de transformação.

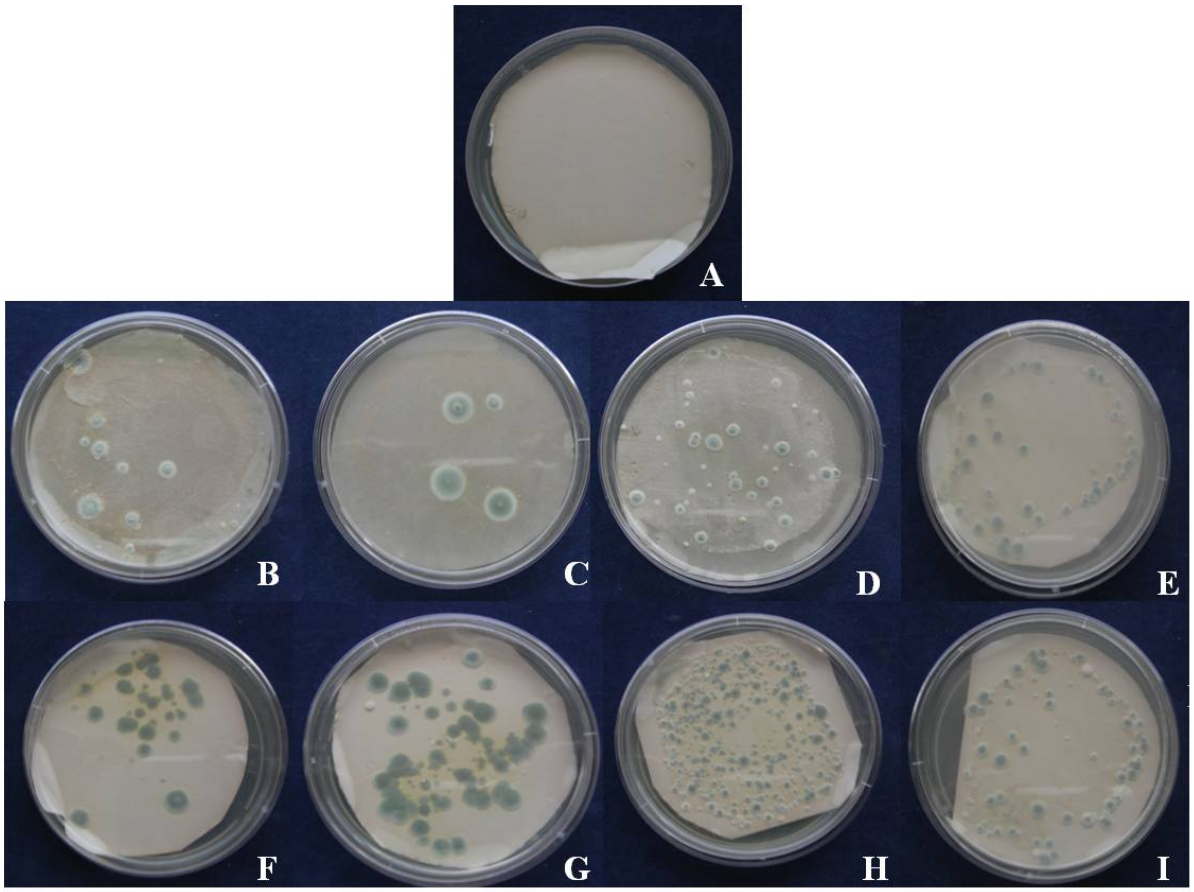

Figura 7 - Aspecto das colônias da linhagem 44 de *P. pinophilum* resistentes a higromicina B, resultado da transformação mediada por *A. tumefaciens* (linhagem EHA 105), crescendo em meio de cultura seletivo BDA após 15 dias de crescimento. A) Controle, meio de cultura seletivo sem adição de acetoseringona; B) Tratamento com 200 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de papel filtro e 24 horas de co-cultivo; C) Tratamento com 400 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de papel filtro e 24 horas de co-cultivo; D) Tratamento com 200 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de papel filtro e 48 horas de co-cultivo; E) Tratamento com 400 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de papel filtro e 48 horas de co-cultivo; F) Tratamento com 200 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de náilon e 24 horas de co-cultivo; G) Tratamento com 400 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de náilon e 24 horas de co-cultivo ; H) Tratamento com 200 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de náilon e 48 horas de co-cultivo; I) Tratamento com 400 $\mu g.mL^{-1}$ de acetoseringona, membrana de náilon e 48 horas de co-cultivo

Como pode ser verificado na Tabela 13, ocorreu um aumento expressivo no número de colônias resistentes quando foi utilizada a membrana de náilon para o co-cultivo entre a bactéria e o fungo. Já a membrana de papel filtro apresentou uma eficiência mais baixa na obtenção dos transformantes nesse sistema (Tabela 13). Entretanto, quando se pensa em uma alternativa de baixo custo, o papel filtro é uma solução, já que o mesmo apresenta razoável número de transformantes. A membrana de náilon de 0,45 µm de porosidade, Amershan Hybond N+, GE Healthcare, (rolo 30 cm x 3 m) foi cotada pela empresa em R$ 1.275,35, enquanto que o papel de filtro foi cotado a R$ 55,00 pacote com 100 unidades[1]. Dessa forma, o importante é adequar seu objetivo. Para o sistema de transformação genética em questão, existindo a necessidade da produção de uma grande quantidade de transformantes, a membrana de náilon é a opção mais adequada. Já se a necessidade for a obtenção de poucos transformantes a escolha pelo papel filtro é uma adequada opção.

Em relação à concentração do indutor acetoseringona, a concentração mais baixa (200 $\mu g.mL^{-1}$) foi a que se mostrou mais eficiente (Tabela 13). Para o teste de Tukey as duas combinações utilizando essa concentração de acetoseringona foram as que apresentaram maior eficiência de transformação (Tabela 14). Entretanto, quando fixado essa concentração, o parâmetro tempo de co-cultivo foi o responsável pela diferença na eficiência. No controle, sem a presença de acetoseringona, não foi possível recuperar nenhum transformante, isso devido ao fato desse composto ser responsável pela indução dos genes *vir* durante o co-cultivo, sendo um fator necessário para a agrotransformação (DE GROOT et al., 1998).

Quando se analisa o teste de Tukey, é possível observar que o tempo de 48 horas de co-cultivo entre a linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* e a linhagem 44 do fungo *P. pinophilum* foi o que apresentou maior eficiência na transformação genética, tanto a 5% como a 1% de significância (Tabela 14). Este tempo de co-cultivo é comumente utilizado para muitos sistemas de transformação (DE GROOT et al., 1998; COVERT et al., 2001; WELD; EADY; RIDGWAY, 2006; ZHONG et al., 2007). Este aspecto foi abordado em diversas pesquisas (GORFER et al., 2007; MATA et al., 2007; RHO; KANG; LEE, 2001; ZEILINGER, 2004; ZHONG et al., 2007).

Dessa forma, avaliando o teste de Tukey (tanto a 5% como a 1% de significância), o tratamento com a combinação dos seguintes parâmetros: 200 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 48 horas de co-

[1] Os valores apresentados foram cotados pela empresa GE Healthcare Life Sciences do Brasil, nos dias 25/06/2010 e 30/06/2010, respectivamente.

cultivo e membrana de náilon foi o que apresentou maior eficiência na obtenção de transformantes para o sistema de transformação em avaliação (Tabela 14).

O que podemos caracterizar é que no presente sistema de transformação, o parâmetro que mais afetou a eficiência de transformação foi o tipo de membrana utilizada. Isso é evidenciado na Tabela 14, já que estes apresentam média de formação de colônias transformadas estatisticamente superior aos tratamentos utilizando papel filtro como suporte. Este fato possivelmente se deve pela maior facilidade que a bactéria encontra de acessar o fungo quando a membrana de náilon é usada. Isso porque a transferência da região T-DNA tem sido mostrada como dependente de uma íntima associação entre as células bacterianas e os conídios dos fungos (DUARTE, 2007), assim a presença de um substrato sólido permite que as células receptoras e doadoras cresçam próximas umas das outras. As diferenças observadas entre os tipos de suporte podem estar relacionadas às propriedades químicas das membranas (SUGUI; CHANG; KWON-CHUNG, 2005) e ao diâmetro dos poros, os quais podem afetar a distribuição e associação de células bacterianas e conídios, resultando em uma menor eficiência de transformação.

Diferentes membranas, tais como nitrocelulose, náilon (Hybond), celofane e papel de filtro, têm sido usadas na etapa de co-cultivo de diversos protocolos, entretanto, membranas de nitrocelulose e Hybond C têm proporcionado menores eficiências de transformação (MICHIELSE et al., 2005; VIJN; GOVERS, 2003) do que o papel de filtro e a Hybond N+ (ZEILINGER, 2004). O efeito positivo da membrana de náilon (Hybond N+) também foi observado para a transformação de *E. nigrum* (FÁVARO, 2009), *A. fumigatus* (SUGUI; CHANG; KWON-CHUNG, 2005), entre outros.

O estudo de diferentes parâmetros para um sistema de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* é de extrema importância, já que é possível a obtenção de um grande número de transformantes (mutagênese insercional) em um curto espaço de tempo e com baixo custo.

Os experimentos de transformação resultaram em uma biblioteca de 1100 transformantes insercionais. A purificação e o estoque das colônias transformadas foram realizados de acordo com o item 2.2.7.5. A elevada quantidade de transformantes obtida no presente trabalho demonstra a aplicabilidade desta metodologia para a geração de transformantes de *P. pinophilum* de maneira relativamente simples, rápida e com baixo custo; permitindo o uso desta estratégia em experimentos de mutagênese insercional aleatória. *P. pinophilum* apresenta grande potencial biotecnológico (controle de fitopatógenos, produção de enzimas, solubilização de fosfato e

produção de AIA), assim o sistema de transformação genética desenvolvido nesse trabalho pode ser utilizado para descoberta de genes envolvidos nesses processos, assim como genes envolvidos na interação com a cana-de-açúcar e outros hospedeiros.

Tabela 13 - Efeito dos diferentes parâmetros sobre a eficiência da transformação [(a)]

Tempo de co-cultivo (horas)	Concentração de AS ($\mu g.mL^{-1}$)	Tipo de membrana	
		Papel filtro	Náilon
24	200	13,333	204,667
	400	14,000	95,000
48	200	28,000	482,667
	400	25,667	197,000

[(a)] A eficiência da transformação corresponde ao número de transformantes obtidos em 1 x 10^7 conídios germinados da linhagem 44 de *P. pinophilum* (média de quinze repetições, ou seja, cinco repetições para cada evento independente de transformação)

Tabela 14 - Teste de Tukey para os diferentes parâmetros sobre a eficiência da transformação

Médias [(a)]	Parâmetros	Teste de Tukey [(b)]	
		5%	1%
482,667	200 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 48 horas de co-cultivo e membrana de náilon	a	A
204,667	200 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 24 horas de co-cultivo e membrana de náilon	b	B
197,000	400 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 48 horas de co-cultivo e membrana de náilon	b	B
95,000	400 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 24 horas de co-cultivo e membrana de náilon	c	C
25,667	400 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 48 horas de co-cultivo e membrana de papel	d	D
28,000	200 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 48 horas de co-cultivo e membrana de papel	d	D
14,000	400 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 24 horas de co-cultivo e membrana de papel	de	DE
13,333	200 $\mu g.mL^{-1}$ de AS, 24 horas de co-cultivo e membrana de papel	de	DE

[(a)] As médias correspondem ao número de transformantes obtidos em 1 x 10^7 conídios germinados da linhagem 44 de *P. pinophilum* (média de quinze repetições, ou seja, cinco repetições para cada evento independente de transformação)

[(b)] Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam nível de significância a 5%, enquanto que letras maiúsculas representam nível de significância a 1%

2.3.6.5 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes

O sistema de transformação genética obtido no presente trabalho teve como objetivo a obtenção de transformantes expressando GFP de forma estável, permitindo assim a análise de interação com cana-de-açúcar. Após 5 passagens sucessivas em meio de cultura não seletivo, ou seja, com ausência de higromicina B, conídios provenientes das colônias da última passagem foram semeados em meio de cultura contendo 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B. Foi possível observar que 100% dos transformantes avaliados mantiveram a capacidade de crescer na presença de higromicina B após as sucessivas repicagens na ausência do antibiótico. Wang e Li (2008) demostraram que 100% dos transformantes de *P. digitatum* foram estáveis mitoticamente. Transformantes de *P. chrysogenum*, com inserção dos genes *vgb* e o gene de resistência à bleomicina também apresentaram 100% de estabilidade (SUN; KONG; XU, 2002). Assim, os dados apresentados corroboram com a literatura, onde altas taxas de estabilidade mitótica têm sido descritas para diferentes espécies fúngicas transformadas com gene *gfp* pelo sistema *Agrobacterium* (FITZGERALD et al., 2003; GORFER et al., 2007; MARTINO et al., 2007).

2.3.6.6 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

Para confirmação da expressão do gene *gfp*, cinco transformantes escolhidos aleatoriamente foram avaliados por microscopia óptica de fluorescência. Em todos os transformantes analisados foi possível observar a emissão de fluorescência tanto nas hifas quanto nos conídios (Figura 8), mesmo após as sucessivas repicagens em meio de cultura sem a higromicina B. Não foi detectada fluorescência nas hifas e nos conídios da linhagem selvagem.

A expressão da proteína GFP foi distribuída ao longo das hifas, principalmente nas extremidades em crescimento ativo. Ao longo do citoplasma foi possível verificar um acúmulo em regiões específicas (Figura 8I), possivelmente representando núcleos, como demonstrado para outros fungos (RODRÍGUEZ-TOVAR et al., 2005; MULER et al., 2006). O acúmulo de GFP livre no núcleo é comum em organismos eucariotos, devido ao pequeno tamanho dessa proteína, o qual está abaixo do tamanho de exclusão para transporte passivo por meio do complexo de poro nuclear (FABRE; HURT, 1994).

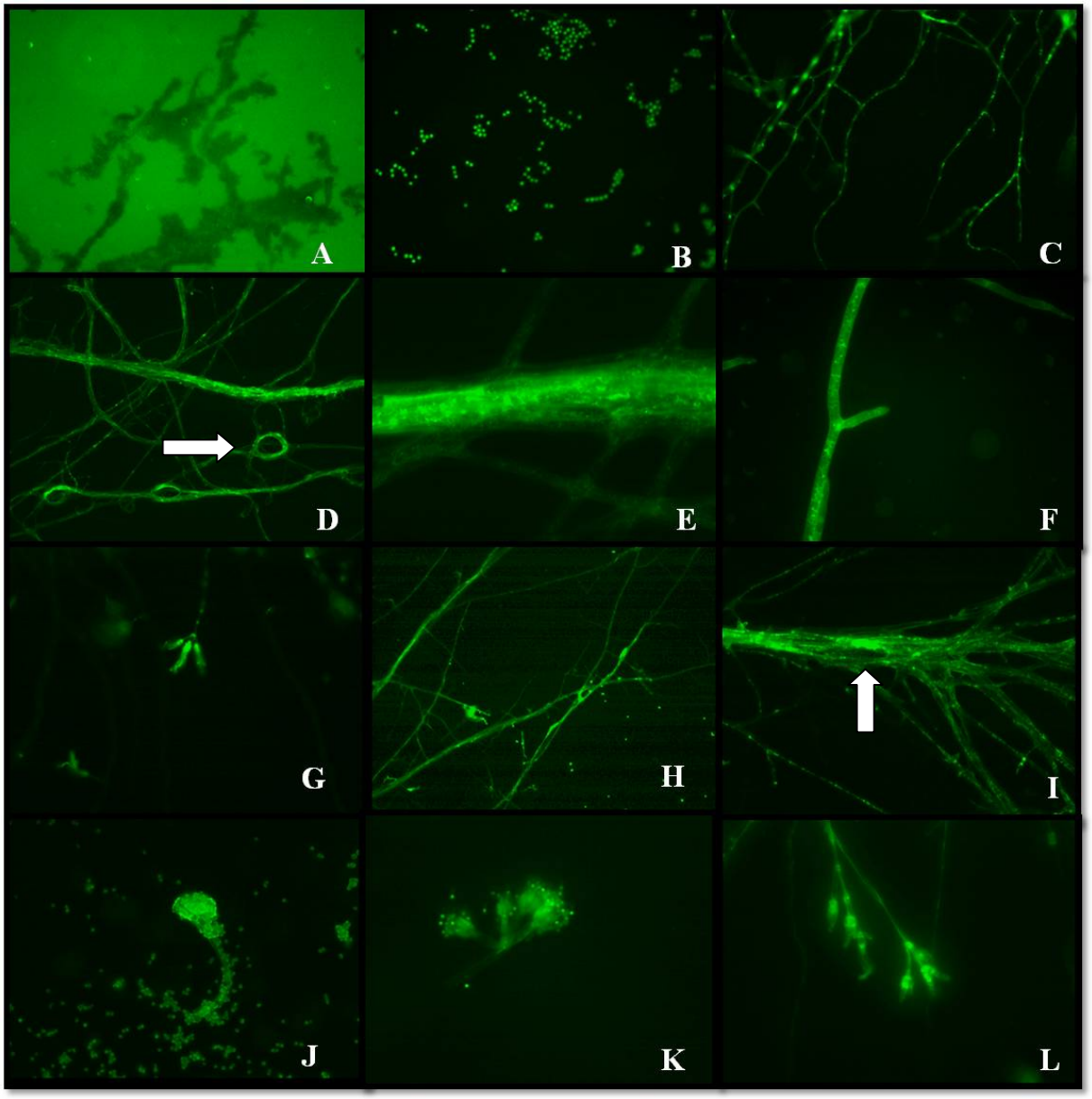

Figura 8 - Análise de microscopia de fluorescência de transformantes da linhagem 44 de *P. pinophilum.* A) Micélio da linhagem 44 não emite fluorescência quando exitados com luz ultravioleta (aumento de 200X). B) Esporos do transformante P12-gfp emitem fluorescência sob luz UV (aumento de 400X). C) Hifas do transformante P28-gfp emitem fluorescência sob luz UV (aumento de 200X). D) Hifas do transformante P4-gfp emitem fluorescência sob luz UV, a seta mostra o enrolamento das hifas (aumento de 100X). E) Detalhe da hifa do transformante P4-gfp (aumento de 630X). F) Detalhe de segmento de hifa fluorescente do transformante P6-gfp; note o acúmulo de regiões fluorescentes ao longo do citoplasma (aumento de 630X). G) Conidióforo do transformante P98-gfp emitindo fluorescência sob luz UV (aumento de 200X). H) Hifas e esporos do transformante P56-gfp emitem fluorescência sob luz UV (aumento de 200X). I) Hifas do transformante P73-gfp emitem fluorescência sob luz UV; a seta indica local de intensa fluorescência (aumento de 200X). J) Conidióforo e conídios do transformante P37-gfp emitindo fluorescência sob luz UV (aumento de 400X). K) Detalhe de um conidióforo e conídios do transformante P50-gfp emitindo fluorescência sob luz UV (aumento de 630X). L) Conidióforos do transformante P16-gfp emitindo fluorescência sob luz UV (aumento de 400X)

2.3.6.7 Confirmação da transformação genética por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A transformação também foi confirmada a partir da amplificação de um fragmento de aproximadamente 750 pb, que corresponde ao gene *gfp* (Figura 9) e por outro fragmento de aproximadamente 600 pb, que corresponde ao gene *hph* (Figura 10). A linhagem selvagem (44) não apresentou nenhum produto de amplificação (Figuras 9 e 10). Wang e Li (2008) demonstraram a estabilidade dos transformantes putativos de *P. digitatum* pela amplificação do gene *hph.* Os mesmos resultados foram encontrados para Fávaro (2009) para transformantes de *E. nigrum.*

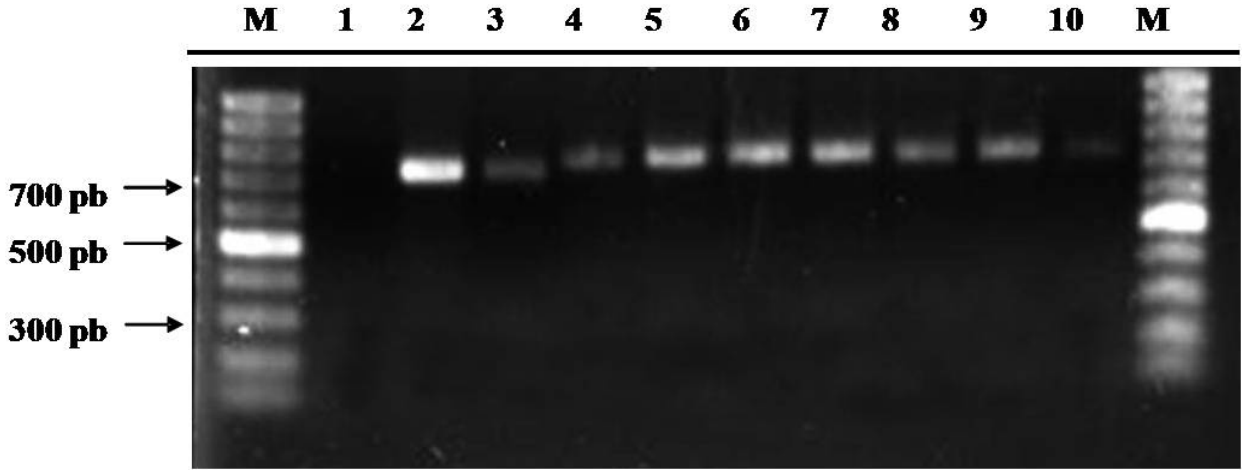

Figura 9 - Amplificação do gene *gfp* com os iniciadores glGFP5 e glGFP3 (FITZGERALD et al., 2003). Linha 1 representa a ausência de amplificação a partir do DNA da linhagem selvagem 44 de *P. pinophilum*; linha 2 representa o fragmento de DNA amplificado a partir do vetor pFAT-gfp; linhas 3 a 10 representam os segmentos de DNA amplificados a partir de oito transformantes escolhidos ao acaso. Linha M contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas Life Sciences, Brasil)

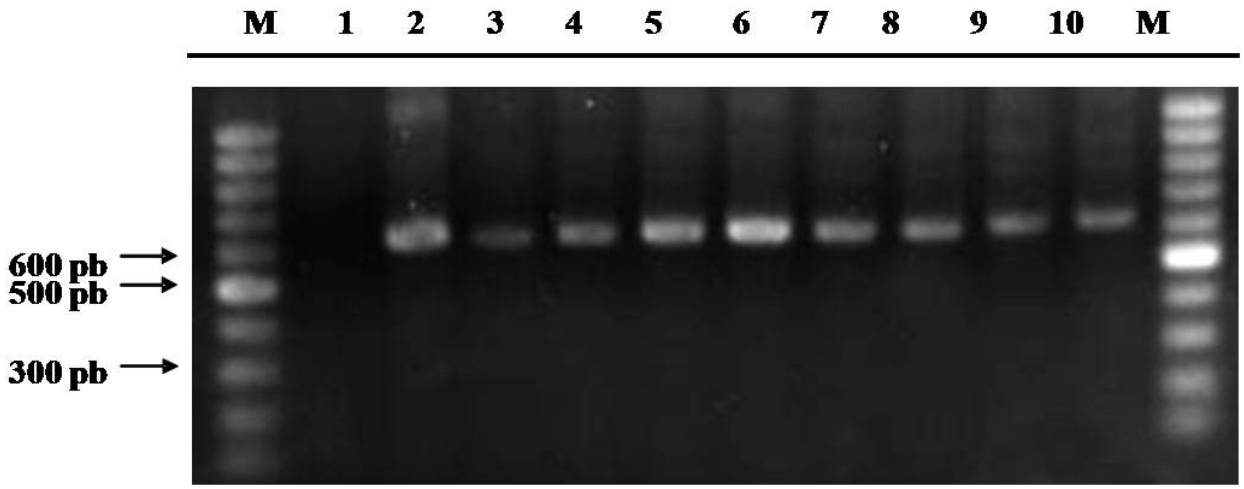

Figura 10 - Amplificação do gene *hph* com os iniciadores hph1 e hph2 (MALONEK; MEINHARDT, 2001). Linha 1 representa a ausência de amplificação a partir do DNA da linhagem selvagem 44 de *P. pinophilum*; linha 2 representa o fragmento de DNA amplificado a partir do vetor pFAT-gfp; linhas 3 a 10 representam os segmentos de DNA amplificados a partir de oito transformantes escolhidos ao acaso. Linha M contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas Life Sciences, Brasil)

2.3.6.8 Análise de *Southern blot*

O número de cópias do T-DNA foi avaliada por *Southern blot*, utilizando como sonda um fragmento de DNA de 700 pb contendo sequência do gene *gfp*. Foram avaliados 5 transformantes, todos apresentaram inserções únicas do T-DNA. Na Figura 11 é possível observar a inserção única do transformante denominado P4-gfp. Entretanto, nenhum sinal de hibridização foi observado para a linhagem selvagem 44 e o vetor pFAT-gfp apresentou uma banda de ~15 kb. A elevada frequência de transformantes de *P. pinophilum* apresentando cópia única do T-DNA (100%) integrada de maneira aleatória no genoma é consistente com os resultados obtidos para várias espécies de fungos que têm sido transformadas por *A. tumefaciens* (MICHIELSE et al., 2005; JEON et al., 2007; BLAISE et al., 2007; HUSER et al., 2009). Wang e Li (2008) realizaram análise de *Southern blot* para 14 transformantes de *P. digitatum* escolhidos aleatoriamente e observaram a produção de um único fragmento, sugerindo inserção única do T-DNA. Transformantes de *P. chrysogenum* também apresentaram inserção de uma única cópia do T-DNA (SUN; KONG; XU, 2002).

O número de cópias do T-DNA inseridas no genoma do fungo é determinada por diferentes parâmetros. O material inicial utilizado pode influenciar, como demonstrado por

Mikosch et al. (2001), onde o uso de conídios germinados levou a maior formação de transformantes contendo múltiplas cópias do T-DNA do que a utilização de micélio, onde houve a predominância de transformantes com uma única cópia. A integração de cópia única é importante para identificação de genes interrompidos pelo T-DNA. Desse modo, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a transformação mediada por *A. tumefaciens* pode ser utilizada como uma ferramenta para mutagênese insercional aleatória nesse fungo, e que as regiões genômicas interrompidas pelo T-DNA podem ser clonadas e identificadas.

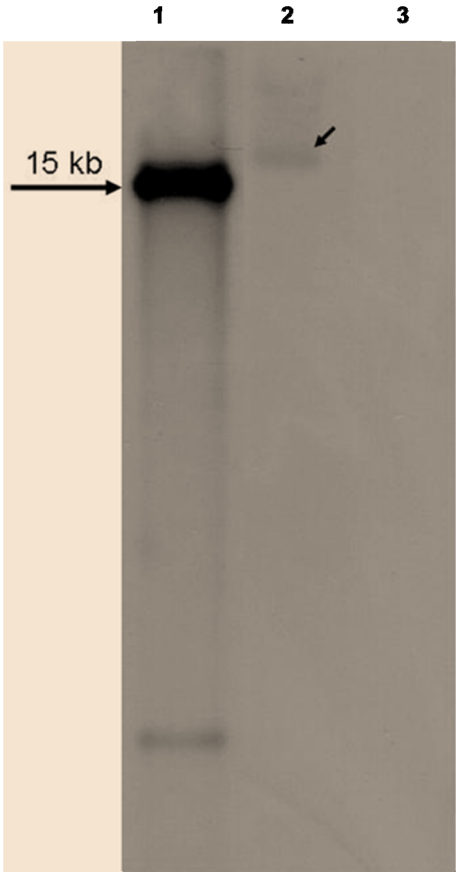

Figura 11 - Hibridização de *Southern blot* para o transformante P754-gfp de *P. pinophilum.* O DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição *Eco*RI, a qual corta o T-DNA duas vezes e não corta internamente o gene *gfp*, corrido em gel de agarose 0,8%, transferido para membrana de náilon e hibridizado com fragmento de 700 pb (gene *gfp*) marcado com digoxigenina. Linha 1 representa o controle positivo (plasmídio pFAT-gfp). Linha 2 representa o transformante. Linha 3 representa o controle negativo (linhagem selvagem 44). As bandas visualizadas estão indicadas com setas

2.3.6.9 Amplificação, clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA

Foram avaliados 15 transformantes quanto a aplicação da técnica TAIL-PCR (LIU et al., 1995) para identificar regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA no genoma dos transformantes. As reações de TAIL-PCR foram consideradas positivas quando a reação terciária produziu um fragmento do tamanho esperado, com base na posição de anelamento dos iniciadores específicos para as bordas do T-DNA.

Utilizando os iniciadores específicos para a borda esquerda (LB) do vetor pFAT-gfp, em combinação com os iniciadores arbitrários AD1, AD2 E AD3 foi possível obter produtos de amplificação única apenas para 6 transformantes. Todos foram obtidos utilizando o iniciador AD2. O tamanho dos produtos de amplificação variou de 600 a 750 pb. Como exemplificado na Figura 12 é possível observar uma diminuição do tamanho dos produtos de PCR, principalmente entre os produtos das reações secundária e terciária, isso devido ao arranjo em *nested* da posição de anelamento do iniciador específico da região do T-DNA. A eficiência de 45% da técnica TAIL-PCR apresentada no presente trabalho corrobora com os dados apresentados por Blaise et al. (2007), onde 45% dos transformantes do fungo *L. maculans* apresentaram produtos de amplificação únicos, sendo que o iniciador AD2 foi superior quanto a eficiência em relação aos iniciadores AD1 e AD3. Entretanto, outros trabalhos apresentaram uma maior eficiência de recuperação de produtos únicos, como é o caso do fungo *E. nigrum* com 75% de eficiência (FÁVARO, 2009) e *F. oxysporum* com 90% de eficiência (MULLINS et al., 2001).

Quando se testou a borda direita (RB) não foi possível a recuperação de nenhum produto na reação terciária, sendo que alguns não apresentaram produtos e outros apresentaram diversas bandas. A baixa eficiência de recuperação desta região também foi relatada para outros fungos (BLAISE et al., 2007; HUSER et al., 2009; FÁVARO, 2009). A ineficiência de recuperação dessa borda pode ser devida a incompatibilidade dos iniciadores utilizados, à inserção de repetições invertidas em tandem (RB para RB) ou ao truncamento desta região antes do sítio de anelamentos dos iniciadores durante a integração no genoma, o que pode interferir com o processo de TAIL-PCR. Mullins et al. (2001) comenta que não é possível recuperar os produtos desejados se as sequências das bordas tornam-se truncadas além dos sítios de anelamentos dos iniciadores específicos, sendo esse um aspecto importante da técnica, o que reduz sua eficiência. Dessa forma, a construção de novos iniciadores ou ainda a utilização de outras técnicas, como

IPCR (PCR inverso), podem ser úteis para a recuperação das sequências dos transformantes (JEON et al., 2007).

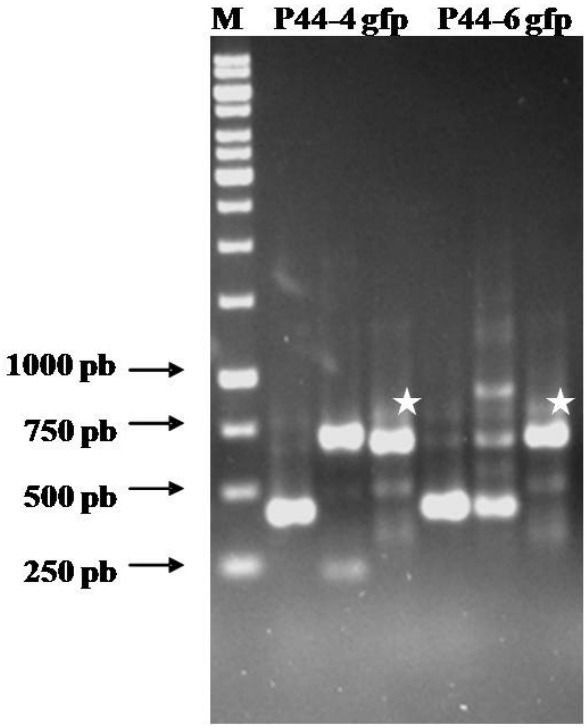

Figura 12 - Análise em gel de agarose dos produtos gerados por TAIL-PCR a partir de 2 transformantes representativos (P4-gfp e P6-gfp, respectivamente). A amplificação desses fragmentos foi realizada com os iniciadores específicos da borda esquerda do T-DNA do vetor pFAT-gfp (LB1-1, LB2-2 e LB3-1) e com o iniciador arbitrário degenerado AD2. A Figura representa os produtos das reações primária, secundária e terciária (da esquerda para direita). Os produtos de amplificação que representam as junções do T-DNA com o genoma do fungo estão correspondentesmarcados com asteriscos, nas colunas correspondentes à reação terciária de TAIL-PCR. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil)

A análise das sequências que flanqueiam a borda esquerda foi realizada para 6 transformantes. Em dois desses a sequência que flanqueia esta região correspondeu a sequência do próprio plasmídio pFAT-gfp, o que caracteriza que nesses transformantes a inserção não foi do T-DNA, mas também do vetor binário. Assim, não foi possível determinar as sequências que flanqueiam a borda esquerda pelo fato desta ter ultrapassado o tamanho de 600 pb. Em outros dois, as sequências não apresentaram alinhamentos significativos com sequências depositadas no GenBank, como resultado do BlastX (dados não mostrados).

Para a sequência de DNA identificada do transformante P6-gfp, foi encontrada baixa identidade com sequências de proteínas depositadas no GenBank. Utilizando a ferramenta

BlastX, o transformante apresentou similaridade (E value= e^{-42}; identidade=40%) como uma proteína hipotética FGSC A4 de *A. nidulans* e de vários fungos onde o genoma tem sido anotado, a qual tem um domínio conservado da família das fenilacetil. Esta família é representada por diversas enzimas (fenilacetil CoA ligase, fenilacetil CoA hidroxilase etc) comuns no metabolismo de microrganismos e catalizam reações químicas (RHEE; FUCHS, 1999).

Para a sequência de DNA identificada do transformante P4-gfp, foi encontrada baixa identidade com sequências de proteínas depositadas no GenBank. Utilizando a ferramenta BlastX, o transformante apresentou similaridade (E value= e^{-4}; identidade=48%) como uma proteína hipotética AN0268.2 de *A. nidulans* e de vários fungos onde o genoma tem sido anotado. Esta proteína é da família SepA, a qual é requerida para formação do septo e tem papel no estabelecimento e manutenção da polaridade das hifas (HARRIS et al., 1997, 1999). MesA, atua como um determinante espacial para estabilizar os eixos de extensão das hifas polarizadas (PEARSON et al., 2004). Esse dado é bastante representativo, já que esse transformante apresentou um enrolamento das hifas, como mostrado na Figura 13. O transformante P4-gfp também apresentou alteração na coloração da colônia, de verde (linhagem selvagem 44) para marrom. Mais uma vez afirmamos a importância da metodologia de transformação genética mediada por *A. tumefaciens*, a qual pode ser utilizada como ferramenta de mutagênese insercional e gerar transformantes representativos para diversas pesquisas, como a identificação de genes envolvidos em processos básicos do fungo, assim como em processos metabólicos e também gene relacionados com a interação endófito-planta.

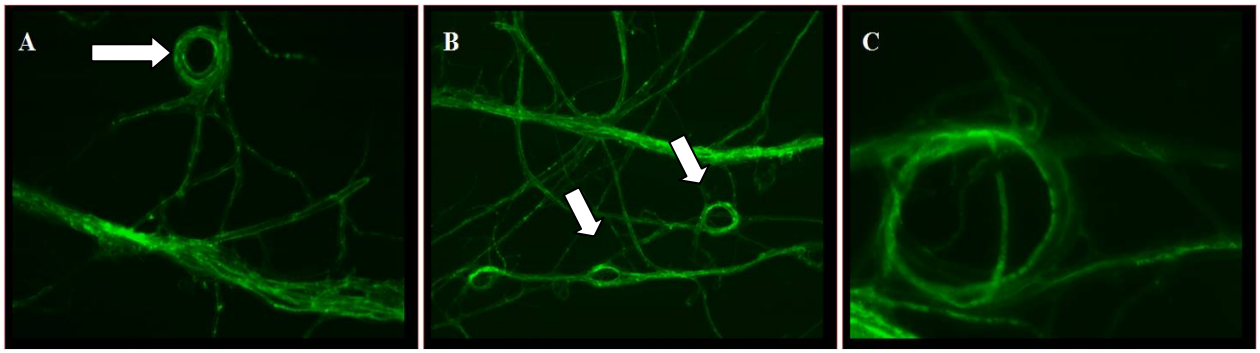

Figura 13 - Análise de microscopia de epifluorescência do transformante de *Penicillium pinophilum* P-4gfp. As hifas emitem fluorescência sob luz UV. As setas indicam o enrolamento das hifas. A) Aumento de 200X. B) Aumento de 100X. C) Aumento de 630X

2.3.7 Interação de *P. pinophilum* e arroz

Com o objetivo de facilitar as análises em plantas de cana-de-açúcar, assim como fazer uma comparação da mesma com outra espécie de planta, foi avaliada a interação de *P. pinophilum* transformado com o gene *gfp* com plântulas de arroz. Os transformantes utilizados foram o P4-gfp e o P6-gfp. Ambos foram escolhidos para a análise por manter a estabilidade mitótica após sucessivas repicagens em meio de cultura não seletivo. Já o transformante P6-gfp foi escolhido por apresentar características morfológicas semelhantes à linhagem selvagem 44, que deu origem a transformação; já o transformante P4-gfp foi escolhido por ser um mutante morfológico e, portanto, apresentar possíveis diferenças em relação ao isolado selvagem. Além disso, ambos foram caracterizados por meio de TAIL-PCR e consequentemente tiveram as regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA no genoma dos transformantes identificadas.

Nos experimentos de interação de *P. pinophilum* com plantas de arroz, assim como com cana-de-açúcar, foram utilizados dois filtros, o FITC (459-490 nm) e o Rodamina (546 nm), para facilitar a visualização do fungo uma vez que as células vegetais das raízes de cana-de-açúcar apresentam grande autofluorescência, e o fungo só emite fluorescência sob filtro FITC, assim é possível distinguir claramente o tecido radicular do fúngico em imagens sobrepostas.

Nos experimentos de interação com arroz foi possível observar que o fungo endofítico de raiz de cana-de-açúcar *P. pinophilum* foi capaz de colonizar endofiticamente essa cultura *in vitro*. O crescimento do fungo foi crescente nos três tempos avaliados (24, 48 e 72 horas). As Figuras 14 e 15 mostram a colonização intercelular nas primeiras camadas do tecido radicular pelos transformantes P4-gfp e P6-gfp, onde é possível visualizar hifa e conídios em interação com as raízes de arroz. Entretanto, foi observado que as plantas de arroz apresentaram sintomas após 7 dias de contato com o fungo, como queima e murcha das folhas. Fungos mutualistas (endófitos e micorrizas) causam mudanças na maquinaria metabólica da planta hospedeira (HARMAN et al., 2004), como por exemplo influência no balanço hídrico da planta (ARNOLD; ENGELBRECHT, 2007; AUGÉ, 2001). A interação endofítica é considerada um balanço entre a resposta de defesa da planta e a demanda de nutrientes do endófito (KOGEL; FRANKEN; HUCKELHOVEN, 2006). No caso da interação entre *P. pinophilum* e plântulas de arroz, após o fungo ter se estabelecido na planta, pode ter ocorrido um desbalanço e os sintomas da doença apareceram. O balanço é afetado por fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Além disso, a colonização de diferentes hospedeiros pode fazer com que os fungos adotem estilos de vida diferentes.

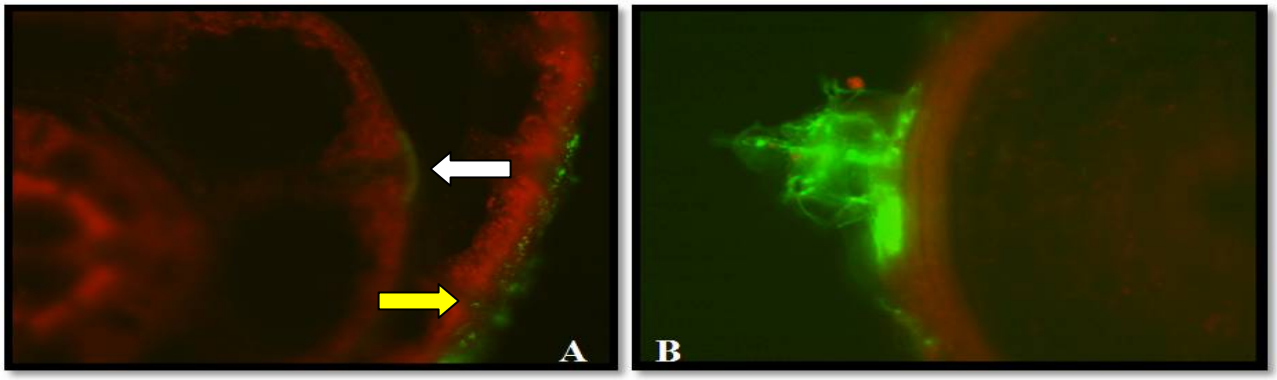

Figura 14 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência, mostrando a colonização de raízes de arroz pelo transformante P4-gfp de *P. pinophilum*. A) A seta branca mostra a presença de uma hifa emitindo fluorescência verde, em um corte transversal de raiz; a seta amarela mostra a entrada de conídios na raiz – Aumento 630 X. B) *P. pinophilum* entrando em contato com células mais internas da raiz de arroz – Aumento 630 X

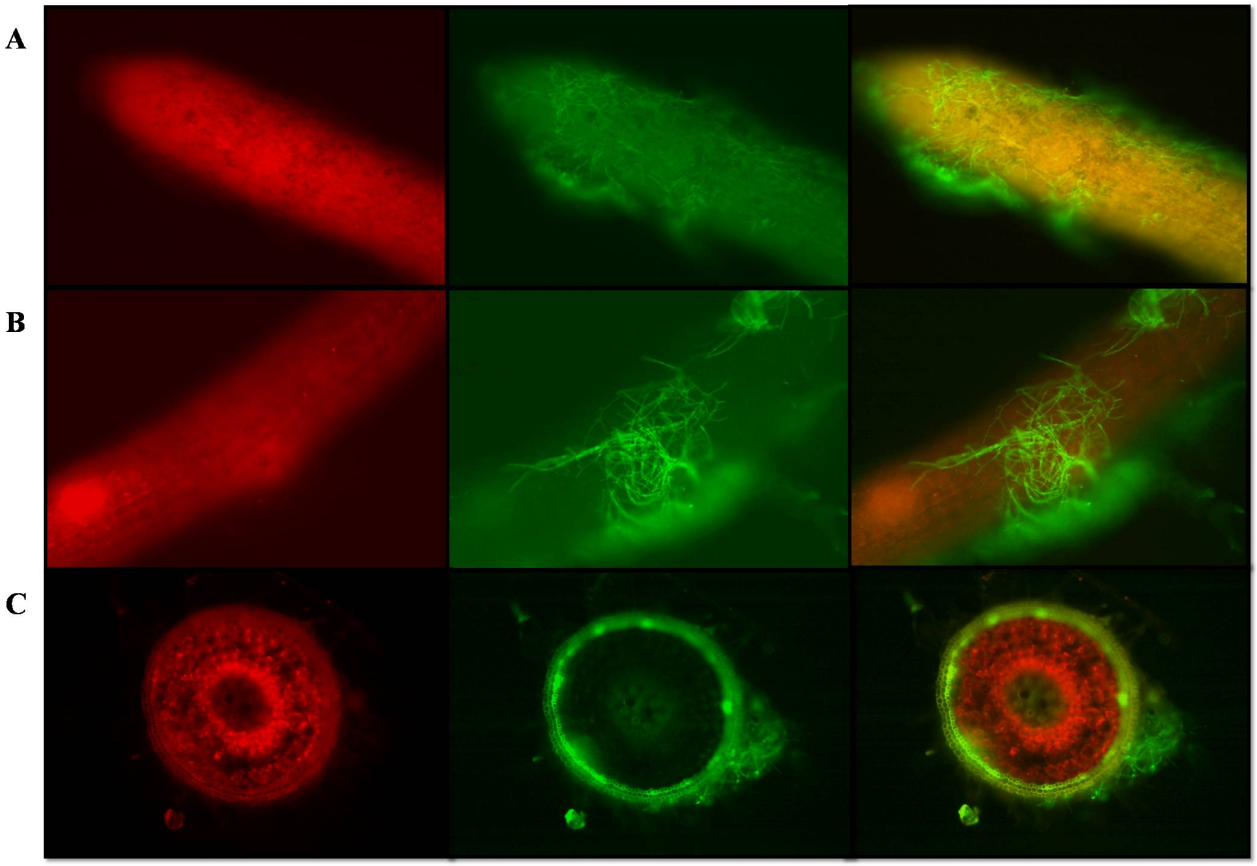

Figura 15 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência (MOF) sob filtro FITC (459-490nm) e Rodamina (546 nm) e com sobreposição das imagens desses filtros, mostrando a colonização de raízes de arroz pelo transformante P6-gfp de *P. pinophilum*. A) Fragmento de raiz inteira de arroz colonizado pelo transformante P6-gfp, com 48 horas de interação. B) Fragmento de raiz inteira de arroz colonizado pelo transformante P4-gfp, com 72 horas de interação. C) Corte transversal de raiz colonizado pelo transformante P4-gfp, com 72 horas de interação. Aumento 100X

Na Figura 16 podemos observar a raiz de arroz colonizada pelo transformante P6-gfp, com 72 horas de interação. O corte transversal mostra um pêlo radicular lateral com intensa presença do fungo. Este fato ocorre principalmente porque esta é uma área com intensa atividade celular e enzimática (emergência e crescimento do pêlo) e também devido à abertura de muitas feridas naturais oriundas desse crescimento. Isso permite um acesso mais rápido e fácil para o fungo ao interior da planta. Fungos endofíticos podem entrar na planta hospedeira por meio de aberturas naturais como estômatos, pêlos ou por entre as células da epiderme através da cutícula via ação de enzimas líticas, como descrito para o fungo *Beauveria bassiana* (WAGNER; LEWIS, 2000). Dessa forma, enquanto alguns fungos utilizam aberturas naturais ou ferimentos para efetuar a entrada, outros desenvolveram mecanismos especializados para transpor barreiras estruturais externas, cutícula e parede celular das células epidérmicas da planta (KNOGGE, 1996). Assim, no caso da interação entre o fungo endofítico de cana-de-açúcar *P. pinophilum* e plântulas de arroz, *in vitro*, ambas as formas foram observadas.

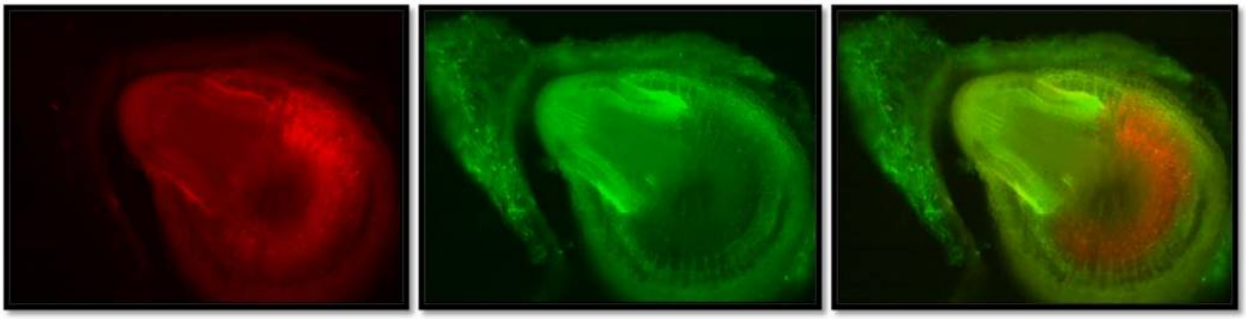

Figura 16 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência (MOF) sob filtro FITC (459-490nm), Rodamina (546 nm) e com sobreposição das imagens desses filtros, mostrando a colonização de raízes de arroz pelo transformante P6-gfp de *P. pinophilum*, com 72 horas de interação. Aumento 100X

2.3.8 Interação de *P. pinophilum* e cana-de-açúcar

Além de desenvolver uma metodologia de transformação genética de *P. pinophilum*, o presente trabalho também desenvolveu um método de reintrodução de uma linhagem geneticamente modificada em plantas axênicas de cana-de-açúcar, e investigou a capacidade de colonização de raízes *in vitro*. Dessa forma, dois transformantes foram escolhidos para as análises: P4-gfp e P6-gfp.

Não foi possível observar emissão de fluorescência nas raízes colonizadas pela linhagem selvagem 44 de *P. pinophilum*. Assim, foi realizada a observação dessa linhagem, que deu origem a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, em microscópio óptico de luz. A Figura 17 mostra a colonização de um corte transversal de raiz pelo fungo, a linhagem 44 se mostrou bastante agressiva, colonizando toda a raiz, mas com preferência pelas pontas. Além disso, podemos novamente enfatizar a importância da utilização do gene *gfp* como gene repórter, devido ao fato desse usar a luz ultravioleta e oxigênio e não requerer cofatores ou substratos como outros repórteres, além do fato de facilitar a visualização da interação (ABELLO; KELEMU; GARCIA, 2008; TANAKA et al., 2006).

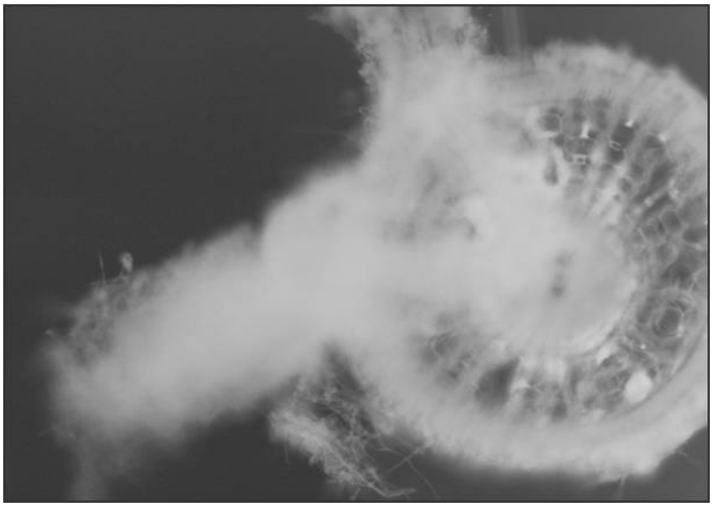

Figura 17 - Imagens de microscopia óptica de luz mostrando a colonização de raiz de cana-de-açúcar pela linhagem selvagem 44 de *P. pinophilum*, com 48 horas de interação. Aumento 100X

2.3.8.1 Análise *in vitro* da interação de transformantes de *P. pinophilum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

A Figura 18 permite a observação do aspecto de raízes de cana-de-açúcar, tanto fragmentos de raízes inteiras, assim como corte transversal, na ausência do fungo. Em todos os experimentos plântulas de cana-de-açúcar sem inoculação foram avaliadas, a fim de confirmar a característica axênica das mesmas.

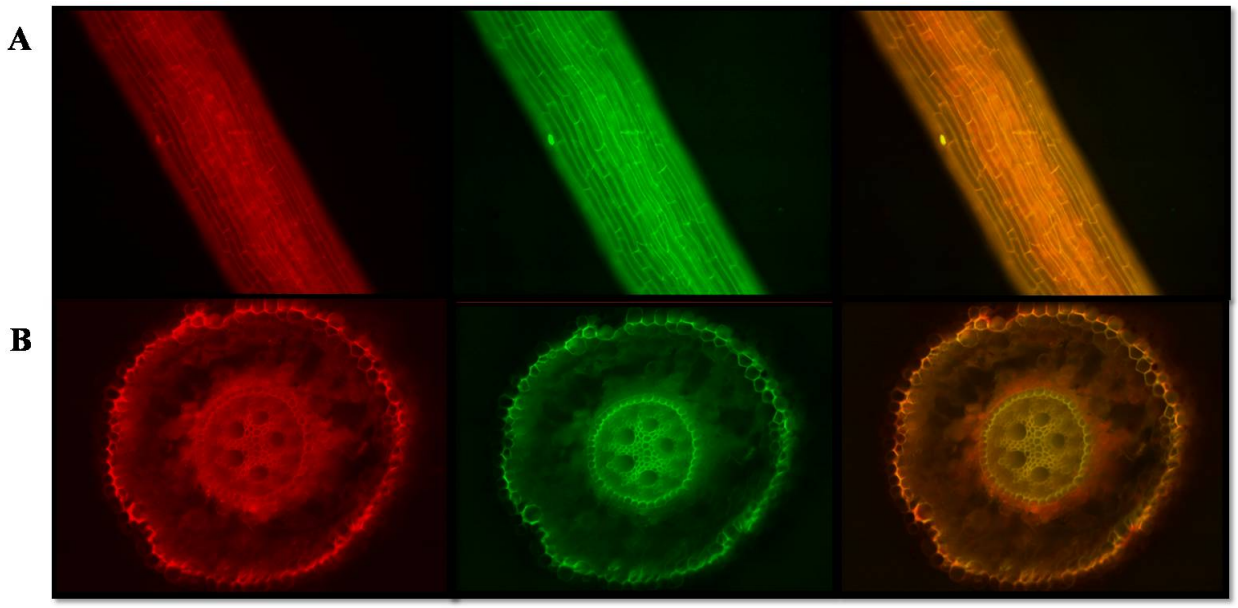

Figura 18 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência (MOF) sob filtro FITC (459-490nm), Rodamina (546 nm) e com sobreposição das imagens desses filtros, mostrando a ausência de colonização do fungo *P. pinophilum*. A) Fragmento de raiz inteira de cana-de-açúcar. B) Corte transversal de raiz de cana-de-açúcar. Aumento 100X

O sistema de transformação obtido no presente trabalho, o qual inseriu o gene *gfp* no fungo endofítico de cana-de-açúcar *P. pinophilum* via *A. tumefaciens* permitiu avaliar a dinâmica de crescimento desse fungo na planta hospedeira. A observação de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com os transformantes P4-gfp e P6-gfp permitiu a visualização de uma densa massa micelial envolvendo as raízes (Figura 19 B e C). Também foi observada a produção de conídios nas amostras coletadas após 72 horas. Além da intensa colonização da superfície das raízes, em alguns cortes transversais foi possível observar colonização intercelular nas primeiras camadas do tecido radicular (Figuras 20 e 21).

O fungo foi bastante agressivo e o crescimento mostrou-se crescente nos três tempos avaliados (24, 48 e 72 horas), com intensa colonização no tempo de 72 horas (Figura 19 C). O transformante P4-gfp apresentou a mesma intensidade de colonização do transformante P6-gfp, entretanto, com 48 horas o primeiro apresentou uma preferência pelas pontas das raízes, esse fato se dá pela questão nutritiva. Já com 72 horas ambos apresentaram o mesmo padrão de colonização, tomando a raiz toda.

Os resultados mostraram que os transformantes de *P. pinophilum* são capazes de colonizar raízes de plantas de cana-de-açúcar endofiticamente, mas raramente coloniza as partes mais superiores da planta (colmos e folhas), no período de tempo avaliado. Dessa forma, podemos

dizer que não ocorre movimentação desse fungo na planta hospedeira nas condições avaliadas nesse trabalho. Wagner e Lewis (2000) mostraram que após a penetração de *B. bassiana* no tecido do hospedeiro, o endófito pode se movimentar de forma passiva no interior do hospedeiro, por meio do xilema.

A colonização de raízes ocorreu em elevada frequência (Figura 21A) e não levou à mudanças fenotípicas aparentes nas plantas. Em comparação aos experimentos de arroz é possível afirmar que *P. pinophilum* se mostrou mais agressivo à cana-de-açúcar, indicando que essa interação é mais eficiente. Esse fato pode ser confirmado pela presença de sintoma de doença em arroz com 7 dias de interação e a ausência desses na interação com cana-de-açúcar. Na interação entre cana-de-açúcar e os transformantes de *P. pinophilum* o fungo pode utilizar-se de mecanismos especializados para transpor barreiras estruturais externas, cutícula e parede celular das células epidérmicas da planta, como a produção de enzimas. A interação fungo-planta é uma relação bastante complexa, na qual a colonização de diferentes hospedeiros pelo mesmo fungo pode fazer com que esse adote estilos de vida diferentes, um exemplo clássico é o patógeno de curcubitáceas, *Colletotrichum magna*, que é isolado como endófito em plantas de outras espécies (FREEMAN; RODRIGUES, 1993). Além disso, pequenas mutações podem causar mudança no estilo de vida. A mutação no gene *path-1* alterou a interação do fungo *C. magna* com curcubitáceas, de patogênico para não patogênico (FREEMAN; RODRIGUES, 1993). Já Tanaka et al. (2006), descreve que mutações em um único gene (*noxA*) do fungo endofítico *Epichloë festucae* levaram a mudanças no seu estilo de vida durante a interação com *Lolium perenne*, que passou de mutualista para parasítico, descrevendo uma nova função para as espécies reativas de oxigênio na regulação da interação mutualística. Guimil et al (2006), realizaram a comparação do transcriptoma de arroz na resposta a colonização de microrganismos, um simbionte microrrízico *Glomalean* e dois patógenos, *Magnaporthe grisea* e *Fusarium moniliforme.* Os autores observaram conservação na resposta à colonização de arroz por simbiontes e patógenos. Esses trabalhos fornecem um maior entendimento da base genética e da plasticidade da interação simbiótica entre fungos e plantas.

Diversos trabalhos têm utilizado a proteína GFP nos estudos de interação endófito-planta. Abello, Kelemu e García (2008) desenvolveram um sistema de transformação mediada por *A. tumefaciens* para o fungo *Acremonium implicatum,* um endófito de *Brachiaria grasses*, o que possibilitou a visualização desse fungo nos tecidos da planta. Os autores ainda reforçam que essa

tecnologia pode ajudar na transferência e expressão de genes com importância agronômica em plantas hospedeiras. Em outro trabalho, o fungo *T. harzianum*, comumente encontrado como saprófita de solos, foi transformado com um vetor contendo o gene *gfp* sob controle de um promotor constitutivo para avaliar a capacidade de colonizar endofiticamente tecidos das raízes de plantas de tomate (CHACÓN et al., 2007).

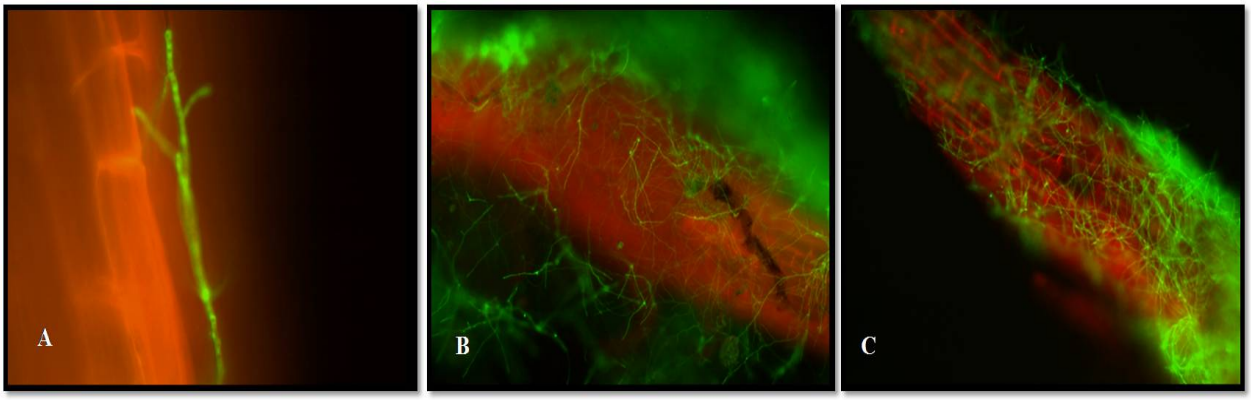

Figura 19 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência (MOF) sob filtro FITC (459-490nm), Rodamina (546 nm) e com sobreposição das imagens desses filtros, mostrando a colonização de raízes de cana-de-açúcar. A) Fragmento de raiz inteira de cana-de-açúcar colonizado pelo transformante P6-gfp de *P. pinophilum*, com 24 horas de interação. B) Fragmento de raiz inteira de cana-de-açúcar colonizado pelo transformante P6-gfp de *P. pinophilum*, com 48 horas de interação. C) Fragmento de raiz inteira de cana-de-açúcar colonizado pelo transformante P6-gfp de *P. pinophilum*, com 72 horas de interação. Aumento 100X

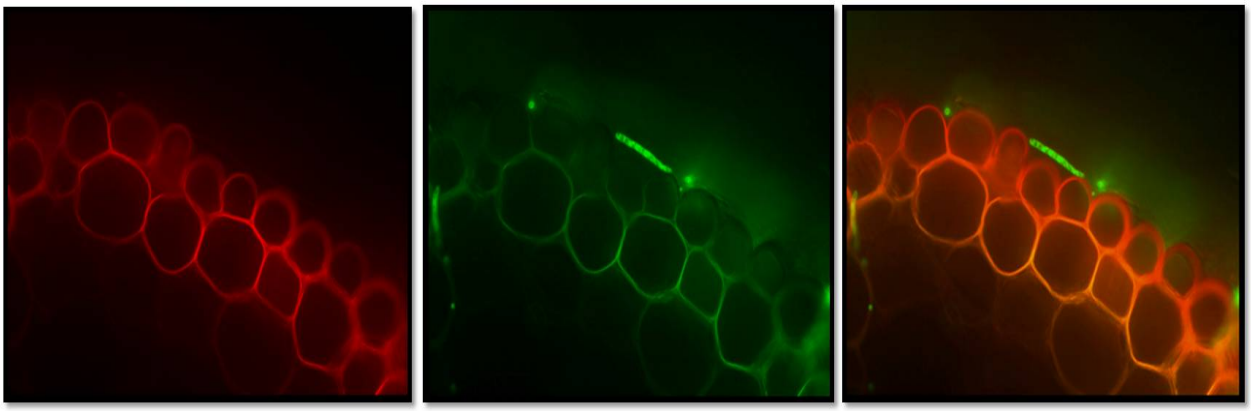

Figura 20 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência (MOF) sob filtro FITC (459-490nm), Rodamina (546 nm) e com sobreposição das imagens desses filtros, mostrando a colonização de raízes de cana-de-açúcar pelo transformante P4-gfp de *P. pinophilum*. A) Corte transversal de raiz, com 48 horas de interação. Aumento 400X

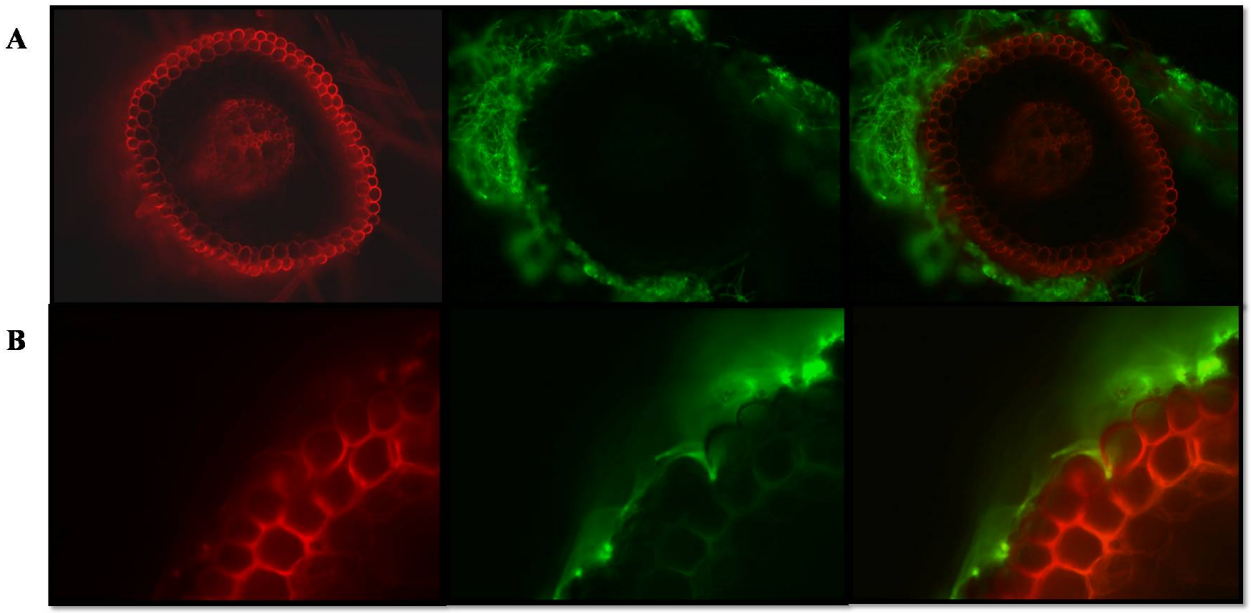

Figura 21 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência (MOF) sob filtro FITC (459-490nm), Rodamina (546 nm) e com sobreposição das imagens desses filtros, mostrando a colonização de raízes de arroz pelo transformante P4-gfp de *P. pinophilum*. A) Corte transversal de raiz colonizado pelo transformante P4-gfp, com 72 horas de interação. Aumento 100X. B) Corte transversal de raiz colonizado pelo transformante P4-gfp, com 72 horas de interação. Aumento 400X

2.3.8.2 Análise *in vitro* da interação de transformantes de *P. pinophilum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por reisolamento

A capacidade do fungo *P. pinophilum* em colonizar tecidos de cana-de-açúcar endofiticamente foi confirmada por reisolamento das linhagens transformadas P4-gfp e P6-gfp, usando como ferramenta para confirmação da identidade do fungo reisolado, a resistência ao antibiótico higromicina B e a expressão da proteína GFP. Essa estratégia, baseada na inoculação e reisolamento do fungo endofítico aplicando os postulados de Koch, tem sido amplamente empregada em estudos que avaliam a capacidade de estabelecimento de uma interação endofítica com a planta hospedeira (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; SCHULZ et al., 1998; SCHULZ et al., 1999; SIEBER, 2007).

O reisolamento confirmou o aumento do número de colônias do fungo nos tempos avaliados (Figura 22), assim como não existe diferença nos padrões de colonização de ambos os transformantes, os quais apresentam números muito próximos de colônias obtidas por placa. Tanto o controle de plântulas sem inoculação dos fungos, assim como a utilizada na última lavagem, não apresentaram o crescimento de colônias do fungo. Esse último controle teve a finalidade de se avaliar a eficiência do processo de desinfecção.

Os dados de reisolamento mostraram que *P. pinophilum* é capaz de colonizar plantas de cana-de-açúcar endofiticamente, e que essa colonização se dá preferencialmente nas raízes dessas plantas, indicando que esse fungo geralmente não se desloca para as partes mais superiores da planta, já que o fungo não cresceu em isolamentos de folhas e colmos de plântulas axênicas de cana-de-açúcar. Possivelmente, esse mesmo fato ocorre na planta *in vivo.* Ruiz-Díez (2002) comenta da possibilidade de desvendar aspectos moleculares da biologia dos organismos, pela correlação de resultados obtidos *in vitro* com as consequências biológicas *in vivo*.

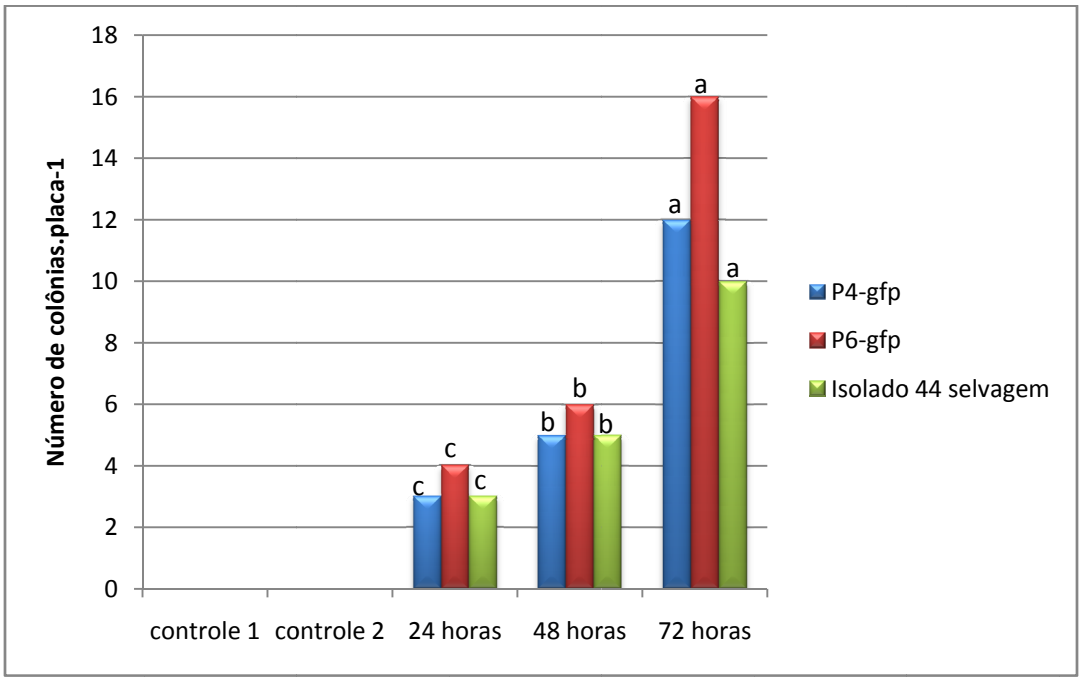

Figura 22 - Frequência de reisolamento de raízes axênicas de cana-de-açúcar. Controle 1 representa plântulas axênicas sem inoculação dos fungos. Controle 2 representa a água da última lavagem. Cada placa continha 7 fragmentos de raízes. O número de colônias representa a média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, diferem pelo teste de Tukey, com nível de significância a 5% para cada transformante

2.3.9 Avaliação da biblioteca de transformantes em relação à secreção de pectina liase e poligalacturonase

Considerando que os isolados da comunidade fúngica do gênero *Penicillium*, formada por isolados endofíticos de raiz e de rizosfera apresentaram elevada secreção das enzimas pectina liase e poligalacturonase, transformantes foram avaliados em relação à produção dessas enzimas. Para isso o método de detecção das enzimas em meio de cultura sólido foi utilizado. Assim, 300 transformantes da linhagem 44 de *P. pinophilum,* resultantes da transformação genética mediada por *A. tumefaciens,* passaram por um *screening* em relação à atividade de pectinases. Todos os transformantes apresentaram produção de pectina liase em níveis próximos aos apresentados pelos isolados avaliados nesse trabalho (dados não mostrados). Entretanto, apenas um transformante (P178-gfp) apresentou ausência de secreção da enzima poligalacturonase.

Dessa forma, foram construídos iniciadores de ambas as enzimas (Tabela 15). Uma das principais técnicas utilizadas em biologia molecular é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Com a utilização desse método é possível amplificar milhares de vezes um fragmento de DNA. O processo de desenho dos iniciadores é uma etapa chave para um PCR bem sucedido, necessitando do conhecimento prévio da sequência de DNA alvo, onde se deseja que esses iniciadores sejam ligados. O desenho dos iniciadores é dividido em várias fases: busca e escolha das sequências de interesse; alinhamento das sequências e determinação do consenso; seleção da região consenso mais conservada, além da escolha e teste dos iniciadores.

Para o transformante P178-gfp, assim como outros transformantes avaliados, foi possível observar a amplificação do fragmento de 680 pb referente ao gene da pectina liase (dados não mostrados). Contudo, para o transformante P178-gfp não foi possível detectar a amplificação do fragmento de 745 pb, representativo do gene da poligalacturonase (Figura 23).

Tabela 15 - Iniciadores construídos, alvo e sequência de bases dos iniciadores

Iniciadores	Alvo	Sequência [(a)]
PL (F)	Pectina liase	GTRTCATCAAGGGCA
PL (R)		TGGAACACGTTACCCTC
PG (F)	Poligalacturonase	CCMGHTGGTGGGAYGG
PG (R)		GWRATNGGRAYHCCG

[(a)] As bases R, M, H, Y e W são bases degeneradas e correspondem a R=A,G; M=A,C; H=A,T,C; Y=C,T e W=A,T

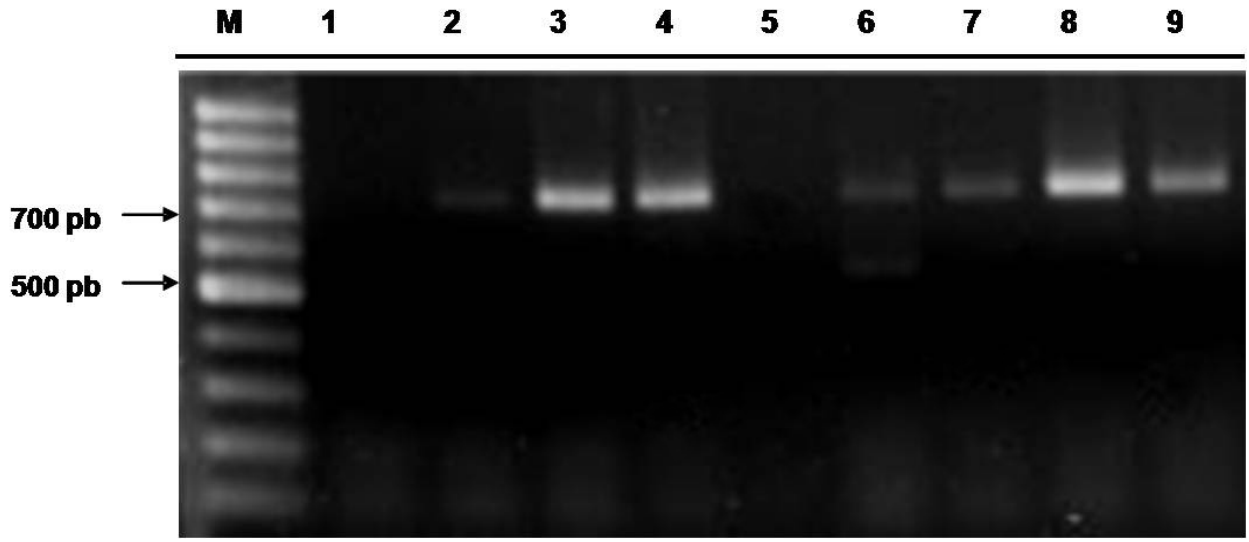

Figura 23 - Amplificação do gene da poligalacturonase. Linha 1 representa a ausência de amplificação a partir do DNA do isolado 267 (*Talaromyces trachyspermus).* Linha 2 a 4 e 6 a 7 representam os segmentos de DNA amplificados a partir de sete transformantes escolhidos ao acaso. Linha 5 representa a ausência de banda para o transformante P178-gfp. Linha M contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas Life Sciences, Brasil)

A parede celular de plantas é constituída principalmente de biopolímeros de celulose, hemicelulose, lignina e pectina (ARO et al., 2005). Enzimas extracelulares de degradação da parede celular da planta hospedeira são produzidas por fungos, bactérias e nematóides, as quais podem ser pectinases, cutinases, celulases, xilanases, proteases, entre outras, mostrando que a parede celular de plantas constitui o fator chave para interação fungo-planta (GOTESSON et al, 2002).

A endopoligalacturonase é uma enzima que hidrolisa ligações galacturosídicas de substâncias pécticas (DEMAIN; PHAFF, 1957 citado por JAYANI et al, 2005). A ação de enzimas pécticas, em particular, a endopoligacturonase na parede celular parece ser um pré-requisito para a degradação da parede celular (MORADAS-FERREIRA et al., 2006).

Com o exposto acima podemos supor que a secreção dessa enzima pelo fungo endofítico de raiz *P.pinophilum* poderia estar relacionada ao processo de interação com a planta hospedeira. Para isso, o transformante P178-gfp foi avaliado em ensaio de interação com plântulas de cana-de-açúcar. Constatou-se que este foi capaz de colonizar a planta por meio de microscopia óptica de fluorescência e reisolamento (dados não mostrados). A enzima endopoligalacturonase pode ser representada por uma única cópia no genoma do fungo, ou estar presente em uma família de multigenes, formando *clusters*. Ten-Have et al. (1998) caracterizaram uma única endopoligalacturonase requerida para a doença causada por *Botrytis cinerea*. Por outro lado, Wubben et al. (1999) descreveram cinco endopoligalacturonases de *B. cinerea*, caracterizando dessa forma toda a família de genes. Assim, mais estudos devem ser realizados em relação ao papel do gene da poligalacturonase na interação *P. pinophilum* e a cana-de-açúcar. Existe a possibilidade deste gene não participar do processo de colonização, assim como esse pode fazer parte de um complexo de genes de endopoligalacturonase.

A maioria das pesquisas com fungos endofíticos é relacionada ao isolamento, descrição de novas espécies, taxonomia e potencial para uso em controle biologico, secreção de metabólitos secundários. A biblioteca de transformantes criada no presente trabalho permitirá estudos relacionados à interação fungo-planta, com a descoberta de genes envolvidos nesse processo. A elevada eficiência de transformação demonstrada permite afirmar que esse sistema de agrotransformação para o fungo *P. pinophilum* tem aplicabilidade como estratégia em experimentos de mutagênese insercional.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunidade fúngica estudada no presente trabalho, composta por isolados de raiz e da rizosfera de cana-de-açúcar, do gênero *Penicillium,* apresenta um grande potencial biotecnológico. Alguns isolados inibiram o crescimento dos fitopatógenos de cana-de-açúcar *Ceratocystis paradoxa, Colletotrichum acutatum* e *Fusarium verticillioides*. Em relação à secreção de enzimas, poucos isolados apresentaram produção das enzimas protease e amilase, 13,72% e 21,57% respectivamente. Entretanto, a maioria dos isolados secretou as enzimas celulase (80,39%), lipase (86,27%), pectina liase (80,39%) e poligalacturonase (88,23%). Os resultados sugerem que a produção de enzimas hidrolíticas por isolados endofíticos de raiz e rizosfera, do gênero *Penicillium,* além de apresentar aspectos de interesse industrial pode ser importante para a nutrição do fungo durante a interação endofítica com cana-de-açúcar.

Os isolados avaliados solubilizaram fosfato inorgânico nos três meios de cultura sólidos avaliados. Quanto à produção de ácido indol acético todos os isolados avaliados produziram esse fitohormônio. Dessa forma, podemos dizer que em condições de campo essa comunidade fúngica possivelmente pode apresentar habilidade em auxiliar na promoção do crescimento vegetal.

O presente estudo descreve pela primeira vez a transformação de *P. pinophilum* pelo sistema *A. tumefaciens.* Este apresentou elevada eficiência (482 transformantes por 10^7 conídios). Portanto, foi possível a obtenção de transformantes resistentes a higromicina B e expressando o gene *gfp.* Com isso, foi desenvolvido um protocolo para estudo de interação entre o fungo e plantas axênicas de cana-de-açúcar *in vitro*. A interação de transformantes de *P. pinophilum* com plântulas de arroz *in vitro* foi avaliada e os resultados mostraram que o fungo foi capaz de colonizar raízes de arroz endofiticamente. Entretanto, após 7 dias de interação, sintomas de doenças começaram a aparecer, como queima e murcha das folhas. Contudo, os transformantes de *P. pinophilum* foram capazes de colonizar raízes de plantas de cana-de-açúcar endofiticamente sem causar mudanças fenotípicas aparentes nas plantas. Não foi detectada colonização nas partes superiores da planta (colmos e folhas) no período de tempo avaliado, ou seja, não houve movimentação do fungo pela planta. O gene da poligalacturonase parece não participar na interação *P. pinophilum*-cana-de-açúcar. Referido gene pode fazer parte de uma família de genes de endopoligalacturonase, requeridos para a interação, no qual a deleção de um único gene não altera os padrões da interação fungo-planta.

A transformação genética também possibilitou a criação de uma biblioteca de mil e cem transformantes insercionais, o que constitui uma ferramenta importante para o estudo molecular do metabolismo secundário desse fungo endofítico e poderá contribuir para o entendimento da interação do complexo fungo-cana-de-açúcar. Em conseqüência, possibilitará no futuro a sua aplicação no melhoramento vegetal e exploração do seu potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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**, Amsterdam, v. 103, p. 1-14, 1997.

ANUÁRIO DA CANA, BRAZILIAN SUGAR AND ETHANOL GUIDE – 2009. Ribeirão Preto. Prol Gráfica, v. 1, 418 p., 2009.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Microbial production of plant hormones. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 133, p. 1-8, 1991.

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

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

ARO N.; PAKULA, T.; PENTTILA M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 719–739, 2005.

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

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

BABANA, A.H.; ANTOUN, H. Effect of Tilemsi phosphate rocksolubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of fieldgrown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 287, p. 51–58, 2006.

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

BAILEY, J.E.; OLLIS D.F. Isolation and utilization of enzymes. In. Biochemistry Engineering Fundamentals. ed. B.J. Clark, B. Tokay, and J.W. Bradley, p. 196. McGraw Hill, Inc., New York, 1977.

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

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

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

BAREA, J.M.; BROWN, M.E. Effects on plant growth by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances **Journal Applied Bacteriology,** Oxford, v. 37, p. 583-593, 1976.

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

BERNHOLDT, H.F. Meat and other proteinaceous foods. In. **Enzymes in food processing**. ed. G. Reed, p.473. Academic Press, New York, 1975.

BLAISE, F.; RÉMY, E.; MEYER, M.; ZHOU, L.; NARCY, J.-P.; ROUX, J.; BALESDENT, M.H.; ROUXEL, T. A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool of pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 123-138, 2007.

BORÉM, A. (1998). Melhoramento de plantas. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 453.

BRAGA, N.R.; MASCARENHAS, H.A.A.; BULISANI, E.A.; RAIJ, B.V.FEITOSA, C.T.; HIROCE, R. Eficiência agronômica de nove fosfatos em quatro cultivos consecutivos de soja . **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 4, p. 315-319, 1991

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

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

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

CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J. F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 447-452, 2003.

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

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

CASTELLANI, A. - The "water cultivation" of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Baltimore, v. 66, p. 283-284,1963

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

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

CHEPLICK, G.P. Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from euroasia and north Africa under extreme resource limitation. **Environmental and Experimental Botany,** Oxford, v. 60, p. 202-210, 2004.

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

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G.P. Effects of insect herbivory and fungi endophytic infection on competitive interations among grasses. **Ecology**, Brooklyn, v.74, p.1767-1777, 1993.

COMBIER, J. P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 220, p. 141-148, 2003.

COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 259-264, 2001.

DE CAL, A.; SAGASTA, E.M.; MELGAREJO, P. Biological control of peach twig blight (Monilinia laxa) with *Penicillium frequentans*. Plant Pathology, v. 39, p. 612-618, 1990.

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

DE STEFANO; S.; NICOLETTI, R.; MILONE, A.; ZAMBARDINO, S. 3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, p. 1399-1401, 1999.

DIANESE, J.C. **Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta/patógeno**. Brasília, Editora Universitária da Universidade de Brasília, 1989, 139 p.

DOTY, S.L. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. **New Phytologist**, Londo, n.2, p.1-16, 2008.

DUARTE, R.T.D.; STAATS, C.C.; FUNGARO, M.H.P.; SCHRANK, A.; VAINSTEN, M.H.; FURLANETO-MAIA, L.; NAKAMURA, C.V.; SOUZA, W.; FURLANETO, M.C. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. acridum. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, p. 248-254, 2007.

DVORNIKOVA, T.P.; SKRYABIN, G.K.; SUVOROV, N.N. Enzymatic transformation of tryptamine by fungi. **Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 32-35, 1970.

ECKERT, M.; MAGUIRE, K.; URBAN, M.; FOSTER, S.; FITT, B.; LUCAS, J.; HAMMOND-KOSACK, K. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 253, p. 67-74, 2005.

EK, M.; LJUNGQUIST, P.O.; STENSTRÖM, E. Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography–mass spectrometry. **New Phytologist**, London, v. 94, p. 401–407, 1983.

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

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

ERIKSSON, O.E.; HAWKSWORTH, D.L. Saccharicola, a new genus for two species on sugar cane. **Mycologia**, Lancaster, v. 95, n. 3, p. 426-433, 2003.

ERNST, M.; MENDGEN, K.W.; WIRSEL, G.R. Endophytic fungal mutualists: seed-borne Stagonospora spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, n. 7, p. 580-587, 2003.

FÁVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. Com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.** 2009. 291p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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

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

FITZGERALD, A. M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 7, p. 803-810, 2003.

FOX, P.F. Proteolysis in milk and dairy products. **Biochemestry Society Transactions**, Hong Kong, v. 10, p. 285, 1982.

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

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

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

GAY, G.; DEBAUD, J.C. Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal Hebeloma species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 26, p. 141–146, 1987.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 16–37, 2003.

GERMAINE K.; KEOGH E.; GARCIA-CABELLOS G.; BORREMANS B.; VAN DER LELIE D.; BARAC T.; OEYEN L.; VANGRONSVELD J.; MOORE F.P.; MOORE, E.R.B.; CAMPBELL, C.D.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 109-118, 2006.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. New York, Willey-Liss, 1994. 485 p.
GOLDSTEIN, A.H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal of Agricultural Economics,** Milwaukee, v. 1, p. 51-57, 1986.

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

GOPINATH, S.C.B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, p. 119-126, 2005.

GORFER, M.; KLAUBAUF, S.; BANDIAN, D.; STRAUSS, J. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 850-855, 2007.

GOTESSON, A.; MARSHALL, J.; JONES, D.A.; HARDHAM, A.R. Characterizatio and Evolutionary Analysis of a Large Polygalacturonase Gene Family in the Oomycete Plant Pathogen *Phytophora cinnamon.* **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 15, n. 9, p. 907-921, 2002.

GRITZ, L.; DAVIES, J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, Amsterdam, v. 25, n. 2-3, p. 179-88, 1983.

GUIJARRO, B., LARENA, I., MELGAREJO, P. AND DE CAL, A. Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by Monilinia spp. **Biocontrol Science Technology**, New York, v. 16, p. 257-269, 2006.

GUIJARRO, B.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Relationship between shelf-life of *Penicillium frequentans*, a biological agent against brown rot disease, and its efficacy against peach brown rot. **Internacional Journal Food Microbiology**, London, v. 113, p. 117–124, 2007.

GUIJARRO, B.; MELGAREJO, R.; TORRES, P.; LAMARCA, N.; USALL, J.; DE CAL, A. *Penicillium frequentans* population dynamics on peach fruits after its applications against brown rot in orchards. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 659–671, 2008.

GUIMIL, S.; CHANG, H.; ZHU, T.; SESMA, A.; OSBOURN, A.; ROUX, C.; IOANNIDIS, V.; OAKELY, E.J.; DOCQUIER, M.; DESCOMBES, P.; BRIGGS, S.P.; AND PASZKOWSKI, U. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 102, p. 8066–8070, 2005.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive products from Endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Clifton, v. 44, n. 2. p. 136-142, 2008.

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

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of the solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 67, p. 597-607, 1975.

HANCOCK, J.K.; MILLAR, R.L. Association of cellulolytic, proteolytic, and xylolytic enzymes with southern anthracnose, spring black stem, and *Stemphylium* leaf spot of alfafa. **Phytopathology**, Lancaster, v. 55, p. 356-360, 1965.

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

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

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

_____. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1422-1431, 2001.

_____. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 9-18, 2004.

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

HEATH, M.C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, p.713-720, 1997.

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

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

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

HOOD, E. E.; GELVIN, S. B.; MELCHERS, L. S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, Amsterdam, v. 2, p. 208-218, 1993.

HUSER, A.; TAKAHARA, H.; SCHMALENBACH, W.; O'CONNELL, R. Discovery of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, p. 143-156, 2009.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble AlPO4 with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 389-395, 1992.

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

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytical enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931– 2944, 2005.

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

JEON, J.; PARK, S.-Y.; CHI, M.-H.; CHOI, J.; PARK, J.; RHO, H.-S.; KIM, S.; GOH, J.; PARK, J.Y.; YI, M.; YANG. S.; KWON, M.J.; HAN, S.S.; KIM, B.R.; KHANG, C.H.; PARK, B.; LIM, S.E.; JUNG, K.; KONG, S.; KARUNAKARAN, M.; OH, H.S.; KIM, H.; KIM, S.; PARK, J.; KANG, S.; CHOI, W.B.; KANG, S.; LEE, Y.H. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. **Nature Genetics**, London, v. 39, p. 561-565, 2007.

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

KADO, C. I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. **Critical Review in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 10, p. 1-32, 1991.

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

KASTER, K. R.; BURGETT, S. G.; RAO, R. N.; INGOLIA, T. D. Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. **Nucleic Acids Research**, London, v. 11, n. 19, p. 6895-911, 1983.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal Applied of Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 473-480, 2004.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agricultur – A Review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.

KEON, J.P.R.; WAKSMEN, G. Common Amino Acid Domain among Endopolygalacturonases of Ascomycetes Fugi. **Applied and environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n.8, p. 2522-2528, 1990.

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

KOGEL, K-H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p.358-363, 2006.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, p.772-786, 2002.

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

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T.S. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 9, p. 81-91, 2002.

KUCEY, J.; STEWART, W.B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 459-464, 1988.

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

LACORTE, C.; MANSUR, E. Transferência de genes através da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógeno-hospedeiro. **Boletim da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, Brasília, v. 21, p. 2-7, 1993.

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

LARENA, P.; SABUQUILLO, P.; MELGAREJO; A.; DE CAL, J. Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* Wilt of Tomato by *Penicillium oxalicum* under Greenhouse and Field Conditions. **Phytopathology**, Lancaster v. 151, p. 507-512, 2003.

LARRAINZAR, E.; O'GARA, F.; MORRISSEY, J. P. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 257-277, 2005.

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

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

LI, M.; GONG, X.; ZHENG, J.; JIANG, D.; FU, Y.; HOU, M. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 243, p. 323-329, 2005.

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

LIU, Y.G.; MITSUKAWA, N.; OOSUMI, T.; WHITTIER, R.F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR.**The Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 457-463, 1995.

LIU, Y.G.; WHITTIER, R.F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. **Genomic**s, Orlando, v. 25, p. 674-681, 1995.

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

LORANG, J. M.; TUORI, R. P.; MARTINEZ, J. P.; SAWYER, T. L.; REDMAN, R. S.; ROLLINS, J. A.; WOLPERT, T. J.; JOHNSON, K. B.; RODRIGUEZ, R. J.; DICKMAN, M. B.; CIUFFETTI, L. M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1987-1994, 2001.

MA, Y.; CHANG , Z.Z.; ZHAO, J.T.; ZHOU, M. Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on *Phytophthora* root rot of chilli pepper. **Biological Control**, Orlando, v. 44, p. 24-31, 2008.

MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. **Current Genetics**, Berlin, v. 40, p. 152-155, 2001.

MANDALARI, G.; BISIGNANO, G.; LO CURTO, R.B.; WALDRON, K.W.; FAULDS, C.B. Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. thermoidea on industrial food processing by-products. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 5130-5133, 2008.

MANDYAM, K.; JUNPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endphyte. **Studies in Mycology,** Baarn, v. 53, p.173-189, 2005.

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

MARIANO, R. DE L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.

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

MARTIN, F.M.; PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Mycorrhizal fungi: a fungal community at the interphase between soil and roots, p. 263–296. In: The rhizosphere. Eds. Pinton, R.; Varanini, Z.; Nannipieri, P. Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y., 2001.

MATA, M. M.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, A. L. M.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 148-151, 2007.

MELGAREJO, P.; CARRILLO, R.; M.-SAGASTA, E. Potential for biological control of *Monilinia laxa* in peach twigs. **Crop Protection**, Crop Protection, v. 5, p. 422-426, 1986.

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

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

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. **New Phytologist**, London, v. 124, p. 193-213, 1993.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi-Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, p. 177-185, 2007.

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

MICHIELSE, C.B.; SALIM, K.; RAGAS, P.; RAM, A.F.J.; KUDLA, B.; JARRY, B.; PUNT, P.J.; HONDEL, C.A.M.J.J. van den. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Molecular and General Genomics**, Berlin, v. 271, p. 499-510, 2004.

MIKKELSEN, L.; SARROCCO, S.; LUBECK, M.; JENSEN, D. F. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, p. 135-139, 2003.

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

MISHRA, N. C.; TATUM, E. L. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in Neurospora. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, p. 3875-3879, 1973.

MITTAL, V.; SINGHA, O.; NAYYARB, H.; KAURA, J.; TEWARI, R. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 718-727, 2008.

MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V.; PIPER, P.; MAGER, W. The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 19, p. 651-658, 1996.

MOY, M.; LI, H.M.; SULLIVAN, R.; WHITE, J.F.Jr.; BELANGER, F.C. Endophytic fungal ß-1,6-glucanase expression in the infected host grass. **Plant Physiology,** Rockville, v. 130, p. 1298-1308, 2002.

MMBAGA, M.T.; SAUVE, R.J.; MREMA, F.A. Identification of microorganisms for biological control of powdery mildew in *Cornus florida*. **Biological Control**, Orlando, v. 44, p. 67-72, 2008.

MUCCIARELLI, M.; SCANNERINI, S.; BERTEA, C.; MAFFEI, M. In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, London, v. 158, p. 579-591, 2003.

MUELLER, D.; STAHL, U.; MEYER, V. Application of hammerhead ribozymes in filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, Amesterdam, v. 65, p. 585-595, 2006.

MULLER, M.M.; VALJAKKA, R.; SUOKKO, A.; HANTULA, J. Diverdity od endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 1801-1810, 2001.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-497, 1962.

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

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 567-572, 1996.

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

NARISAWA, K.; KAWAMATA, H; CURRAH, R.S.; HASHIBA, T. Supression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 103-109, 2002.

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

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 23, p. 6-8, 2005.

NICOLETTI, R.; BUOMMINO, E.; DE FILIPPIS, A.; LOPEZ-GRESA, M.P.; MANZO, E; CARELLA, A.; PETRAZZUOLO, M.; TUFANO, M.A. Bioprospecting for antagonistic *Penicillium s*trains as a resource of new antitumor compounds. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 189-195, 2008.

NOUT, M.J.R.; ROMBOUTS, F.M. Recent developments in tempe. **Research Journal Applied Bacteriology**, Hoboken, v. 69, p. 609-633, 1990.

O'CONNELL, R.; HERBERT, C.; SREENIVASAPRASAD, S.; KHATIB, M.; ESQUERRE´-TUGAYE´, M. T.; DUMAS, B. A novel *Arabidopsis*-*Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant–fungal interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 272-282, 2004.

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

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

OMAR, S.A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbusular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology Biotechnology,** New York, v. 14, p. 211-218, 1998.

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

OSBOURN, A. Host microbe interactions: molecular intimacy exposed: probingplant-fungus interactions. **Current opinion of microbiology**, New York, v. 4, p. 363-364, 2001.

OWEN, N.L.; HUNDLEY, N. Endophytes - the chemical synthesizer inside plants. **Science Progress**, London, v. 87, p. 79-99, 2004

PANACCIONE, D.G.; JOHNSON, R.D.; WANG, J.; YOUNG, C.A.; DAMRONGKOOL, P.; SCOTT, B.; SCHARDL, C.L. Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 22, p. 12820-12825, 2001.

PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P.D. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. Wallingford: CAB internacional, 1994, 136 p.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n. 29, 2002. Disponível em: www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>.Acesso em 20 jun 2008.

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

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

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

POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 2, p. 17-33, 1999.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v. 5, p. 141-238, 1953.

PRADHAN, N.; SUKLA, L.B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 10, p. 850-854, 2005.

QUEENER, S.W.; INGOLIA, T.D.; SKATRUD, P.L.; CHAPMAN, J.L.; KASTER, K.R. A system for genetic transformantion of Cephalosporium acremonium. In: Schlessinger, D. (Ed.), **Microbiology**, American Society for Microbiology, p. 468- 472, 1985.

REDDY, P.V.; LAM, C.K.; BELANGER, F.C. Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be importante in fungal pathogenicity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 1209-1218, 1996.

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

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

REYES, I.; BERNIER, L.; ANTOUN, H. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. **Microbial Ecology of Leaves,** New York, v. 44, p. 39-48, 2002.

RHO, H. S.; KANG, S.; LEE, H. Y. *Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells**, London, v. 12, p. 407-411, 2001.

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

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

RODRÍGUES-TOVAR, A. V.; RUIZ-MEDRANO, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUEROA, B. E.; HIDALGO-LARA, M. E.; REYES-MÁRQUEZ, B. E.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDÉZ, M.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 63, p. 45-54, 2005.

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

ROGERS, C. .; CHALLEN, M.P.; GREEN, J.R.; WHIPPS, J.M. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 241, p. 207-214, 2004.

ROGERS, S.G.; HORSH, R.B.; FRALEY, R.T. Gene transfer I plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. In: WEISSBACH, A.; WEISSABACH, H., ed. Plant molecular biology, Academic Press, 627-640. (Methods in Enzymology, 118), 1986.

ROMÃO, A.S. **Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* - planta hospedeira**. 2010. 270p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

RUDRESH, D. L.; SHIVAPRAKASH, M. K.; PRASAD, R. D. Effect of combined application of *Rhizobium,* phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 139-146, 2005.

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

ROLLOF, J.; BRACONIER, J.H.; SODERSTROM, C.; NILSSON-EHLE, P. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. **European Journal Clinical Microbiology Infection Diseace**, Berlin, v. 7, p. 505-510, 1988.

SABUQUILLO, P.; DE CAL, P.; ELGAREJO, M.A. Biocontrol of tomato wilt by *Penicillium oxalicum* formulations in different crop conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 37, p. 256-265, 2006.

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

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

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

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

SCHARDL, C.L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M.J. Symbioses os grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology,** Palo Alto, v. 55, p. 315-340, 2004.

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

SCHULZ, B.; GUSKE, S.; DAMMANN, U.; BOYLE, C. Endophyte-host interactions II - defining symbiosis of the endophyte-host interaction. **Symbiosis**, Rehovot, v. 25, p. 213-227, 1998.

SCHULZ, B.; ROMMERT, A. K.; DAMMANN, U.; AUST, H. J.; STRACK, D. The endophytehost interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Cambridge, v. 10, p. 1275- 1283, 1999.

SCOTT, B. *Epichloë* endophytes: fungal symbionts of grasses. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 4, p. 393-398, 2001.

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

SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. Suppression of Nigrospora oryzae (Berk. & Broome) Petch by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 122, p. 35-43, 2008.

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

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology,** Oxford, v. 42, p. 155-159, 2006.

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

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhock,** Amesterdam, v. 23, p. 15-22, 1957.

SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. New York: Academic Press, 1997. 605p. 109, p. 661-686, 2005.

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

St. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D.W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and enthomopathogenic fungi to the requeriments of their ecological niches. **Microbiology**, Readim, v. 143, p. 1983-1992, 1997.

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

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

SUGUI, J. A.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1798-1802, 2005.

SUN, C. B.; KONG, Q. L.; XU, W. S. Efficient transformation of *Penicillium chrysogenum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for cloning of Vitreoscilla hemoglobin gene. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 5, p. 21-28, 2002.

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

TANAKA, A.; CHRISTENSEN, M. J.; TAKEMOTO, D.; PARK, P.; SCOTT, B. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. **Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1052-1066, 2006.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, London, v. 18, p. 448-459, 2001.

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

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 Interaction**, St Paul, v. 11, p. 1009-1016, 1998.

THORN, G. The fungi in soil, p. 63–127. In: Modern soil microbiology. Eds. van Elsas, J.D.; Trevors, J.T.; Wellington, E.M.H. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1997.

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

TORRES, M.; DOLCET, M. M.; SALA, N.; CANELA, R. Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. J**ournal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 3328-3333, 2003.

TUDZYNSKI, B.; SHARON, A. Biosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones. In The Mycota. Vol. X. Industrial Applications (H.-D. Osie cwacz, ed.) Springer Verlag, Berlin: p. 183-212, 2002.

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

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

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

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

VELA, G.M.; MOLINERO-ROSALES, N.; OCAMPO, J.A.; GARCÍA-GARRIDO, J.M. Endocellulase activity is associated with arbuscular mycorrhizal spread in pea symbiotic mutants but not with its ethylene content in root. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 786-792, 2007.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 127-141, 2001

VIJN, I.; GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, p. 459-467, 2003.

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

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

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

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

WALTON, J.D. Deconstructing the Cell Wall. **Plant Physiology,** Rockville, v. 104, p. 1113-1118, 1994.

WANG, J. Y.; LI, H. Y. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, Hong Kong, v. 9, p. 823-828, 2008.

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

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

WELD, R. J.; EADY, C. C.; RIDGWAY, H. J. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 202-207, 2006.

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

WHITE Jr., J.F.; BELANGER, F.; MEYER, W.; SULLIVAN, R.F.; BISCHOFF, J.F.; LEWIS, E.A. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytics – development of symbiotic interaction with plant. **Symbiosis,** Rehovot, v. 33, p. 201-213, 2002.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Edited by Donald L. Sparks. Advancesin Agronomy, **Academic press**, New York, v. 69, p. 99-151, 2000.

WUBBEN, J.P.; MULDER, W.; TEN HAVE, A.; VAN KAN J.A.L.; VISSER, J. Cloning and partial Characterization of Endopolygalacturonase Genes from *Botrytis cinerea.* **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p.1596-1602, 1999.

XU, L.; ZHOU, L.; ZHAO, J.; LI, J.; LI, X.; WANG. J. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, p. 68-72, 2008.

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

ZALACAIN, M.; GONZALEZ, A.; GUERRERO, M. C.; MATTALIANO, R. J.; MALPARTIDA, F.; JIMENEZ, A. Nucleotide sequence of hygromycin B phosphotransferase gene of *Streptomyces hygroscopicus*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 14, p. 1565-1581, 1986.

ZAYED, G.; MOTAAL, H.A. Bioactive composts from rice straw enriched with rock phosphate and their effect on the phosphorus nutrition and microbial community in rhizosphere of cowpea. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 929-935, 2005.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 54-60, 2004.

ZENG, S.R.; XU, Q.W.; YE, B.T.; KE, Y.; FANG, B.Y.; HUANG, X.M. Isolating of Endophytic Fungi from Five Medicinal Plants and Screening of Their Antibacterial Activities. **Journal of Fungal Research**, Hong Kong, v. 3, p. 24-26, 2005.

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

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

ZHANG, P.; XU, B.; WANG, W.; QIAN, Z.; TANG, S.; HUAN, S.; REN, S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insercional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffei*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 943-949, 2008.

ZHANG, N.; SCOTT, V.; AL-SAMARRAI, T.H.; SPIERING, M.J. MCMILLAN, L.K.; LANE, G. A.; SCOTT, D.B.; CHRISTENSEN, M.J.; SCHMID, J. Transformation ryegras endophyte *Neotyphodium lolli* can alter its *in plant* mucelial morphology. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p.601-611, 2006.

ZHONG, Y.H.; WANG, X.L.; WANG, T.H.; JIANG, Q. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 73, p. 1348-1354, 2007.

ZHUANG, X.; CHEN, J.; SHIM, H.; BAI, Z. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environment International**, New York, v. 33, p. 406-413, 2007.

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