**VARIABILIDADE, TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E
TRANSPOSONS EM LINHAGENS ENDOFÍTICAS DE *Fusarium*
moniliforme ISOLADAS DE MILHO (*Zea mays* L.).**

JOÃO ALENCAR PAMPHILE
Biólogo

Orientador: Prof. Dr. **JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração: Genética
e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Pamphile, João Alencar

Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens endofíticas de *Fusarium moniliforme* isoladas de milho (*Zea mays* L.) / João Alencar Pamphile. - - Piracicaba, 1997.
199 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Fusário 2. Marcador molecular 3. Milho 4. Transformação genética I. Título

CDD 633.15
632.44

**VARIABILIDADE, TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E TRANSPOSONS
EM LINHAGENS ENDOFÍTICAS DE *Fusarium moniliforme* ISOLADAS
DE MILHO (*Zea mays* L.)**

JOÃO ALENCAR PAMPHILE

Aprovado em: 26/6/1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Profa. Dra. Maria Lúcia C. Vieira

Prof. Dr. Cláudio Costa

Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz

Prof. Dr. José Odair Pereira

ESALQ/USP

ESALQ/USP

UNESP

U.F.V.

U.F.A.

Prof. João Lúcio de Azevedo

Orientador

Ofereço aos meus amados pais George Wilberforcer Pamphile
(*In memorian*) e Adelyr Teixeira Pamphile.

Dedico aos meus irmãos Carla, Elizabeth, George,
Marta, Paulo, Ronald, e sobrinhos Bruno, Jéssica,
Raquel, Rodrigo e William.

“O microorganismo está (é) — sempre certo
seu amigo
um parceiro sensível

Não existem microorganismos estúpidos

Microorganismos — podem
irão — fazer qualquer coisa

Microorganismos são — mais inteligentes
mais sábios
mais energéticos — do que
químicos,
engenheiros, etc.

Se você cuidar dos seus amigos microbianos, eles irão cuidar do seu futuro (e você irá viver feliz mesmo após)”. Perlman, D. (1980).

AGRADECIMENTOS

*A DEUS e aos meus ESPÍRITOS BENFEITORES pela minha sustentação neste processo evolutivo.

*Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, exemplo maior de cientista, pela amizade, por ter me apoiado em todos os momentos importantes durante o meu Doutorado, pela atenção e paciência constantes, pelo incentivo, por ter sido o meu ORIENTADOR.

*À Dra. Marie-Josée Daboussi, pela oportunidade de realizar parte do meu doutorado (Experimentos de Transformação Genética) em seu Laboratório de Genética Molecular de Fungos Fitopatogênicos na Universidade de Paris, pela amizade e co-orientação.

*À Dra. Maria Lúcia C. Vieira, pelo auxílio na otimização do RAPD, pelas facilidades concedidas em seu laboratório, pelas valiosas sugestões.

*Ao Dr. Cláudio Lopes de Souza Junior, pela concessão das linhagens de milho utilizadas neste trabalho.

*À Dra. Elza Áurea Luna A. Lima, do Depto. de Micologia da UFPe., pela identificação das linhagens de fungos, pela amizade e exemplo de cientista.

*À Dra. Debora Maria Massa Lima, do Depto. de Micologia da UFPe, pela confirmação das linhagens de *Fusarium*.

*À Dra. Aline Pizzirani-Kleiner, pelas facilidades concedidas, apoio e sugestões.

*Ao Dr. Thierry Langin pelas sugestões e auxílio na interpretação de dados.

*À Dra. Carmem L. M. S. C. Rocha, pela amizade, apoio e acolhida inestimáveis. Por ter assumido as minhas aulas durante o meu estágio na França. Por me ter aberto a porta à carreira do magistério.

*À Dra. Marisa Vieira de Queiroz, por ter me iniciado na Biologia Molecular, pela sua grande amizade, apoio em todos os momentos e sugestões constantes.

*Ao Dr. Cláudio Costa, pela acolhida e amizade, por continuar a ser um irmão.

*Ao Alexandre O. de Souza, meu irmãozinho, pelo companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

*Ao Renato A. Martins, pela amizade, acolhida e companheirismo.

*À Catherine Gerlinger pela paciência e auxílio na realização dos experimentos de transformação; ao Quirico Mighelli, Aurelie, Francine, Jean Michel, Jean Piere, Wally, Marc Henri e Clérie, pela amizade e colaboração, por terem tornado a minha estadia na França a mais agradável possível.

*Ao Luciano e Giseli Consoli e Carmem R. Roldan pela amizade, apoio e pelos momentos agradáveis em Paris. Valeu!

*Ao técnico José Antonio da Silva (Zezo), e estagiárias Gislaine e Joelma, do laboratório de microrganismos da ESALQ, pelo auxílio na obtenção dos mutantes.

*À Dra. Marialba A. C. Prado, pela amizade e excelente convivência e apoio, por ter assumido as aulas de uma das minhas turmas da graduação durante o meu estágio na França.

*Aos colegas do Departamento de Biologia Celular e Genética da UEM pela ótima convivência e apoio, em especial à Isabel Cristina, Alberto, Sonia e Ana Sílvia, por terem assumido as minhas aulas da graduação durante o meu estágio na França.

*Aos Profs. Luis Antonio de Souza e Neusa Altoé, reitor e vice-reitora da UEM, pela autorização especial que me permitiu realizar o estágio no exterior.

*Ao Prof. Paulo César Mathias, pelo apoio e facilidades concedidas durante a sua gestão na chefia do DBC/UEM que permitiram o meu estágio na França.

*Aos Profs. Verônica E. P. Vicentini e Valter Della Rosa, atuais chefe e vice-chefe do DBC/UEM pelo apoio e facilidades concedidas para a conclusão deste trabalho.

*À Francielle Baptista pelo auxílio na realização dos gráficos.

*Ao Marcelo Guedes Cavalcante pela amizade e companheirismo inestimáveis..

*Aos meus amigos Vilson Brasil e Sandro Guzzo pela camaradagem e feliz convivência em Maringá.

*Aos colegas de laboratório da ESALQ/USP, em especial ao Wellington Araujo pela acolhida, Adriana Longo, José O. Pereira, Margarete Nadalini, Renata Pascon, Luciana Ribeiro, Luciana Regitano, Chirlei Glienke, Rosemeire Bueno, André Lima, Carlos Vildoso, Iara Fino, Gilda e Adilson Silva.

*Aos professores da ESALQ/USP.

*Às secretárias Léia e Carmem, às bibliotecárias Silvana e Elizabeth, aos funcionários de campo Juscelino e Alfredo, ao Fernando e Oberdan e aos demais funcionários da ESALQ/USP.

*Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos modalidade Doutorado e Doutorado-Sandwiche no Exterior.

*À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

*À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa “Microrganismos Endofíticos: análise molecular de sua variabilidade e interações com o hospedeiro ao nível metabólico”.

*A todos os integrantes do Grupo Saraí, encarnados e desencarnados, pela sustentação espiritual. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xviii
SUMMARY.....	xx

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 3

2.1. Microrganismos endofíticos	3
2.1.1. Definição	3
2.1.2. Especificidade dos organismos endofíticos às plantas	5
2.1.3. Aplicações biotecnológicas	9
2.1.3.1. Controle de pragas e doenças.....	9
2.1.3.2. Portadores / hospedeiros para transformação genética de plantas.....	14
2.2. <i>Fusarium</i> spp.....	16
2.2.1. <i>Fusarium moniliforme</i>.....	19
2.3. Variabilidade genética: mutação	21
2.4. Variabilidade genética: marcadores moleculares	26
2.4.1.1. Marcadores RFLP	27
2.4.1.2. Marcadores RAPD.....	30
2.4.1.2.1. RAPD em <i>Fusarium</i> sp.	36
2.5. Transformação genética.....	41
2.5.1. Transformação genética : sistema da nitrato redutase (NIA).....	44
2.5.2. Transformação genética: sistema higromicina e outros marcadores de resistência.....	46
2.5.3. Transformação genética: sistema GUS	50
2.6. Transposons.....	54

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 62

3.1. Material Biológico e Locais de coleta.	62
3.1.1. Linhagens de milho utilizadas para o isolamento de fungos.....	62
3.1.2. Locais de coleta	63
3.2. Isolamento e método de cultura	64
3.3. Preparo de filtros, palitos de transferência e esterilização.	64
3.3.1. Filtros Buchner para filtração de micélio.....	64
3.3.2. Uso de palitos para transferência de colônias.	65
3.3.3. Esterilização e incubação	65
3.4. Meios de cultura de uso geral	65
3.4.1. Meio mínimo (MM) (PONTECORVO <i>et alii.</i> , 1953).....	65
3.4.2. Meio completo sólido (MC) (PONTECORVO, <i>et al.</i> 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).....	66
3.4.3. Meio completo líquido	66
3.4.4. Meio mínimo líquido (PONTECORVO <i>et al.</i> , 1953).....	66
3.4.5. Solução de vitaminas	67
3.4.6. Meio Batata-Dextrose (BDA)	67
3.4.7. Meio Batata-Dextrose (BDA) + Extrato de levedura + Caseína hidrolisada.....	68
3.4.8. Meio BDA suplementado líquido.....	68
3.5. Soluções estoque de uso geral.....	68
3.5.1. Solução de EDTA 0,5M.....	68
3.5.2. Solução de NaCl 5M.....	68
3.5.3. Solução de NaOH (1 M)	68
3.5.4. Solução salina 0.85%p/v	69
3.5.5. Solução SSC 20X.....	69
3.5.6. Solução SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio).....	69
3.5.7. Solução Denhardt's 100X	69
3.5.8. Solução de Acetato de Potássio 5M.....	70
3.5.9. Solução de Acetato de Amônio 7,5M	70
3.5.10. RNase	70
3.5.11. Solução de Brometo de Etídio (MANIATS <i>et al.</i> , 1989).....	71
3.5.12. Tampão da amostra (6x).....	71
3.6. Análise de variabilidade genética via RAPD.....	71
3.6.1. Clorofane.....	71
3.6.2. Clorofil	71
3.6.3. Fenol saturado (Modificado de Maniats <i>et al.</i> , 1989) modificado	71
3.6.4. Géis de agarose (p/v)	72
3.6.5. Solução de dNTP	72
3.6.6. Enzima Taq-DNAPolimerase (CENBIOT/RS)	72
3.6.7. Solução de Oligonucleotídios iniciadores (primers).....	73
3.6.8. Tampão de Reação (10x)	73
3.6.9. Tampão de corrida TEB (10x).....	73

3.6.10. Tampão de Extração de DNA.....	73
3.6.11. Tampão Tris-EDTA (TE).....	74
3.6.12. Extração de DNA (RAEDER & BRODA, 1985), modificado:	74
3.6.13. Quantificação do DNA.....	75
3.6.14. Amplificação do DNA (PCR).....	75
3.6.15. Análise de Polimorfismo	76
3.7. Transformação genética.....	77
3.7.1. MGSO ₄ -1,2M	77
3.7.2. MS.....	77
3.7.3. TMS	77
3.7.4. TMSC	78
3.7.5. TRIS-EDTA CaCl ₂	78
3.7.6. PEG 60%.....	78
3.7.7. Soluções usadas na transferência de DNA para a membrana de nylon.....	78
3.7.7.1. Solução de depurinação (HCl 0,25N).....	78
3.7.7.2. Solução de denaturação.....	78
3.7.7.3. Solução de neutralização.....	79
3.7.8. Soluções de Tratamento de Membranas para Hibridização <i>In Situ</i>	79
3.7.8.1. Solução 1	79
3.7.8.2. Solução 2	79
3.7.9. Solução de Hibridização	80
3.7.10. Soluções de lavagem.....	80
3.7.10.1. Solução 1	80
3.7.10.2. Solução 2	80
3.7.11. Soluções de deshibridização.....	80
3.7.11.1. Solução 1	80
3.7.11.2. Solução 2	81
3.7.12. Tampão de Extração de DNA.....	81
3.7.13. Tampão TE	81
3.7.14. Tampão Tris-Acetato [TAE (50 X)]	81
3.7.15. Géis de agarose (p/v).....	82
3.7.16. Obtenção de mutantes (<i>nia</i> ⁻).....	82
3.7.17. Meios seletivos utilizados na obtenção e identificação dos mutantes <i>nia</i> ⁻	84
3.7.17.1. Meio Basal.....	84
3.7.17.1.1. Solução de Elementos Traço	84
3.7.17.2. Meio Mínimo (=Meio Nitrato)	84
3.7.17.3. Meio BDA+Clorato de Potássio	85
3.7.17.4. Meio nitrito.....	85
3.7.17.5. Meio Hipoxantina	85
3.7.17.6. Meio Amônio.....	85
3.7.17.7. Meio Ácido úrico	85

3.7.18. Obtenção de protoplastos	86
3.7.19. Transformação genética	87
3.7.20. Plasmídios utilizados.....	88
3.7.21. Cotransformação genética	90
3.7.22. Extração de DNA (mini-prep)	90
3.7.23. Digestão Enzimática do DNA	91
3.7.24. Hibridizações	92
3.7.25. Hibridização “Southern blotting”	92
3.7.26. Hibridização <i>In Situ</i>	93
3.7.27. Preparo das sondas.....	94
3.7.28. Deshibridização	94
3.7.29. PCR.....	95
3.7.30. Análise Qualitativa da expressão do gene da beta-glucuronidase nos transformantes.	95
3.7.30.1. MUG (10mM).....	96
3.7.31. Análise histoquímica da atividade GUS	96
3.7.32. Esterilização (RODRIGUES, 1996) modificado, inoculação e cultivo das sementes de milho	96
3.7.32.1. Meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).....	97
3.7.33. Coloração para a atividade GUS	98
3.7.33.1. Solução de coloração para GUS (WILSON <i>et al.</i> , 1995), modificado..	98
3.7.33.2. Tampão fosfato pH 7,0.....	99
3.7.33.2.1. Solução 1	99
3.7.33.2.2. Solução 2	99
3.7.33.3. Tampão cacodilato 0,1 M.....	99

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO100

4.1. Isolamento	100
4.2. Análise de variabilidade genética via RAPD.....	114
4.2.1. Padronização da técnica e seleção de oligonucleotídeos iniciadores	114
4.2.2. Polimorfismo por RAPD	118
4.3. Estudos de transformação genética em <i>F. moniliforme</i>.	127
4.3.1. Obtenção dos mutantes <i>nia</i> ⁻	127
4.3.2. Transformação Genética de <i>F. moniliforme</i> com o gene <i>nia</i> de <i>F. oxysporum</i>	128
4.3.2.1. Análise molecular dos transformantes	134
4.3.3. Cotransformação de <i>F. moniliforme</i> com os genes <i>gusA</i> de <i>E.coli</i> e <i>nia</i> de <i>F. oxysporum</i>	139

4.3.3.1. Análise molecular dos transformantes	144
4.3.3.2. Localização Histoquímica da atividade da β -glucuronidase nas raízes de milho infectadas com o transformante TG3.....	150
4.3.4. Estudo da transposição genética do elemento <i>Impala</i> de <i>F. oxysporum</i> em <i>F. moniliforme</i>	155
4.3.4.1. Experimentos de cotransformação de <i>F. moniliforme</i> com o elemento <i>Impala</i> e uma fonte de transposase.....	155
4.3.4.2. Seleção dos revertentes <i>nia</i> ⁺	161
4.3.4.2.1. Análise dos revertentes via PCR.....	164
4.3.4.3. Análise dos eventos de reinserção do elemento <i>Impala</i>	166
<u>5. CONCLUSÕES.....</u>	<u>171</u>
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>173</u>

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 3.1. Relação das linhagens retiradas ao acaso das populações P1 (BR-105) e P2 (BR-106), empregadas no experimento	63
Tabela 3.2. Identificação de mutantes de <i>F. moniliforme</i> baseado em testes de crescimento (modificada de KLITTICH & LESLIE, 1988)	83
Tabela 4.1. Percentagens de colonização das linhagens de milho por fungos endofíticos em cada local. (%).....	100
Tabela 4.2. Percentagens de colonização das populações de milho por fungos endofíticos (%).	101
Tabela 4.3. Percentagem de fungos endofíticos por linhagens de milho encontrados no local 1 (Areão).	103
Tabela 4.4. Percentagem de fungos endofíticos por linhagens de milho encontrados no local 2 (Caterpillar).	103
Tabela 4.5. Percentagem de fungos endofíticos em sementes de milho por local de isolamento.	105
Tabela 4.6. Isolados de <i>F. moniliforme</i> de sementes de milho de diferentes genótipos, coletadas de dois locais diferentes, com seus referidos códigos utilizados nos experimentos de RAPD.	114
Tabela 4.7. Componentes da reação de amplificação do DNA de <i>F. moniliforme</i> . ..	117
Tabela 4.8 Sequência de nucleotídeos (5'→3') e conteúdo de bases CG dos sete oligonucleotídeos utilizados.....	118
Tabela 4.9. Número total de locos detectados e de locos polimórficos gerados pelos oligonucleotídeos, nos 21 isolados de <i>F. moniliforme</i>	120
Tabela 4.10. Mutantes <i>nia⁻</i> obtidos pela seleção positiva para resistência ao clorato.	128
Tabela 4.11. Influência da quantidade de esporos do inóculo inicial na obtenção de protoplastos.....	129
Tabela 4.12. Transformação genética com pNH24 utilizando-se 4×10^7 protoplastos de três diferentes linhagens..	129
Tabela 4.13. N° de transformantes obtidos com pNH24 em um experimento em que ensaiou-se duas concentrações diferentes de protoplastos.....	130
Tabela 4.14. N° de transformantes obtidos com a linhagem S68 em um experimento em que ensaiou-se duas concentrações diferentes de plasmídios.	131
Tabela 4.15. N° de transformantes obtidos em um experimento utilizando-se duas linhagens diferentes.	132

Tabela 4.16. Porcentagens de transformantes e cotransformantes Gus no experimento de cotransformação.....	141
Tabela 4.17. Linhagens utilizadas, sua designação na tese e seus códigos no estoque:	145
Tabela 4.18. Número de transformantes e percentagem de cotransformação obtidos em experimentos de cotransformação no sistema Impala.	161

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 2.1. Via da Utilização do Nitrato em <i>A. nidulans</i> e <i>Neurospora crassa</i> (CORRELL <i>et al</i> , 1987).....	23
Figura 2.2 Os três casos possíveis de integração de genes carregados por plasmídios introduzidos por transformação em fungos filamentosos (AZEVEDO, 1995).....	43
Figura 3.1 Representação esquemática dos plasmídios utilizados nos experimentos de transformação genética.....	88
Figura 4.1. Colonização das populações de milho por fungos endofíticos nos dois locais: Areão (local 1) e Caterpillar (local 2).....	102
Figura 4.2. Relação entre as linhagens de milho e a frequência dos fungos isolados na região de Areão.	104
Figura 4.3. Relação entre as linhagens de milho e a frequência dos fungos isolados na região de Caterpillar.	105
Figura 4.4. Distribuição de fungos endofíticos em sementes de milho nos dois locais.	106
Figura 4.5. Padrão de bandas obtido no ensaio para ajuste da concentração de DNA do isolado L3 com o oligo OPX07. As concentrações utilizadas foram (em ng): 2) 30; 3) 60; 4) 90; 5) 120 e 6) 150. 1) marcador de peso molecular (DNA λ clivado com Hind III).....	116
Figura 4.6. Padrões de RAPDs obtidos com o oligonucleotídeo OPX7 usando os DNAs de 21 linhagens de <i>Fusarium</i> como molde. 1. marcador de peso molecular λ Hind III; 2. marcador de peso molecular “ladder”; 3 a 23: L1 a L21, respectivamente; 24. marcador de peso molecular “ladder”.....	121
Figura 4.7. Matriz de similaridade obtida a partir do coeficiente de Jaccard, para os isolados de <i>F. moniliforme</i> isolados de sementes de milho.	122
Figura 4.8. Fenograma gerado a partir da metodologia “UPGMA algoritmo” para agrupar os 21 isolados de <i>F. moniliforme</i> . Os valores indicados acima referem-se aos coeficientes de similaridade e à direita, os códigos dos isolados de <i>Fusarium</i>	123
Figura 4.9. Análise molecular dos transformantes de <i>F. moniliforme</i> obtidos com pNE24 e hibridizados com o plasmídio pNH24 linearizado com a EcoRI e marcado com ^{32}P . 1, linhagem recipiente S61; de 2 a 12, transformante T.N.1,	

T.N.2, T.N.3, T.N.4, T.N.5, T.N.6, T.N.7, T.N.8, T.N.9, T.N.10, plasmídio pNH24 clivado com EcoRI.....	137
Figura 4.10. Análise molecular dos transformantes de <i>F. moniliforme</i> obtidos com pNE24 e hibridizados com o plasmídio pUC marcado com ³² P. 1, linhagem recipiente S61; de 2 a 12, transformante T.N.1, T.N.2, T.N.3, T.N.4, T.N.5, T.N.6, T.N.7, T.N.8, T.N.9, T.N.10, plasmídio pNH24 clivado com EcoRI.....	138
Figura 4.11. Seleção de cotransformantes GUS em transluminador (UV).....	140
Figura 4.12. Análise da expressão GUS de cotransformantes purificados em transluminador (UV).....	143
Figura 4.13. Análise molecular dos cotransformantes de <i>F. moniliforme</i> obtidos com pNE24 e pNOM102 hibridizados com o fragmento 4,5 Kb HindIII-EcoRI do pNOM102, contendo toda a construção GUS e marcado com ³² P. 1, linhagem selvagem L25; de 2 a 11, cotransformante TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7, TG8, TG9 e TG10.	148
Figura 4.14. Análise molecular dos cotransformantes de <i>F. moniliforme</i> obtidos com pNE24 e pNOM102 hibridizados com o plasmídio pNH24 linearizado com a enzima EcoRI e marcado com ³² P. 1, linhagem selvagem L25; de 2 a 11, cotransformantes TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7, TG8, TG9 e TG10.	149
Figura 4.15. Localização histoquímica da atividade GUS no micélio do transformante GUS ⁺ (TG3) nas raízes de 10 dias. O precipitado azul indica a localização da atividade da enzima GUS no micélio. A) aumento de 400X; B) visualização em maior aumento (1000X) do campo anterior, mostrando em maior detalhe os micélios do transformante com o precipitado azul; C) e D) outras regiões da raiz apresentando micélios com o precipitado azul (ambas em aumento de 1000X).....	153
Figura 4.16. Localização histoquímica da atividade GUS no micélio do transformante GUS ⁺ (TG3) nas raízes de 10 dias. O precipitado azul indica a localização da atividade da enzima GUS no micélio. A a C) Aumento de 1000X. Essas raízes foram previamente clarificadas com hipoclorito de sódio 2,5%.	154
Figura 4.17. Semeadura dos protoplastos cotransformados (Impala-Hygro). Observam-se algumas colônias com crescimento mais vigoroso (setas), correspondentes aos transformantes Hygro, e o crescimento residual dos protoplastos que não tiveram o plasmídeo contendo a resistência à higromicina integrado (não transformantes ou transformantes abortivos).....	157
Figura 4.18. Transformantes Hygro e mutante em placa BDA + Higromicina (18,2 µg/ml).....	158
Figura 4.19. Hibridizações <i>in situ</i> de transformantes higromicina com o gene <u>niaD</u>	160

Figura 4.20. Análise molecular dos cotransformantes e revertentes de *F. moniliforme*. O DNA genômico (5-10µg) foi digerido com EcoR1 e os fragmentos resultantes separados em eletroforese de gel de agarose 0,8%.. O DNA foi transferido para membrana de nylon e hibridizado com o gene *niaD* de *Aspergillus nidullans* marcado com ^{32}P . Canaletas: 1, cotransformante COT.A1; 2, revertente REV.A1 (que foi obtido do COT.A1); 3, COT.A2; 4, REV.A2; 5, COT.A3; 6, REV.A3; 7, COT.A4; 8, REV.A4; 9, COT.A5; 10, REV.A5; 11, COT.A6; 12, REV.A6.162

Figura 4.21. Análise molecular dos cotransformantes e revertentes de *F. moniliforme*. O DNA genômico (5-10µg) foi digerido com EcoR1 e os fragmentos resultantes separados em eletroforese de gel de agarose 0,8%.. O DNA foi transferido para membrana de nylon e hibridizado com o gene *niaD* de *Aspergillus nidullans* marcado com ^{32}P . Canaletas: 1, cotransformante COT.E2; 2, revertente REV.E2 (que foi obtido do COT.E2); 3, COT.E3; 4, REV.E3.1; 5, REV.E3.3; 6, REV.E3.4; 7, REV.E3.5.163

Figura 4.22. Perfil eletroforético do PCR dos revertentes utilizando-se os oligonucleotídeos C1 e C145. Canaletas: 1, REV.A1; 2, REV.A2; 3, REV.A3; 4, REV.A4; 5, REV.A5; 6, REV.A6; 7, REV.E1; 8, marcador de peso molecularLadder; 9, REV.E2; 10, REV.E3.1; 11, E3.3; 12, REV.E3.5.165

Figura 4.23. Análise molecular dos cotransformantes e revertentes de *F. moniliforme*. O DNA genômico (5-10µg) foi digerido com Eco R1 e os fragmentos resultantes separados em gel de agarose 0,8%. O DNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridizada com o elemento *Impala*-160 marcado com ^{32}P . Canaletas: 1, cotransformante COT.A1; 2, revertente REV.A1 (que foi obtido do COT.A1); 3, COT.A2; 4, REV.A2; 5, COT.A3; 6, REV.A3; 7, COT.A4; 8, REV.A4; 9, COT.A5; 10, REV.A5; 11, COT.A6; 12, REV.A6. Os fragmentos contendo *Impalas*-160 reinseridos estão indicados por setas.167

Figura 4.24. Análise molecular dos cotransformantes e revertentes de *F. moniliforme*. O DNA genômico (5-10µg) foi digerido com Eco R1 e os fragmentos resultantes separados em gel de agarose 0,8%. O DNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridizada com o elemento *Impala*-160 marcado com ^{32}P . Canaletas: 1, cotransformante COT.E2; 2, revertente REV.E2 (que foi obtido do COT.E2); 3, COT.E3; 4, REV.E3.1; 5, REV.E3.3; 6, REV.E3.4; 7, REV.E3.5. Os fragmentos contendo *Impalas*-160 reinseridos estão indicados por setas.168

VARIABILIDADE, TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E TRANSPOSONS EM LINHAGENS ENDOFÍTICAS DE *Fusarium moniliforme* ISOLADAS DE MILHO (*Zea mays* L.).

Autor: JOÃO ALENCAR PAMPHILE

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO:

A espécie *Fusarium moniliforme* é encontrada freqüentemente em sementes de milho, sendo essa possivelmente a sua forma de inóculo no campo. *Fusarium* spp. são associados com plantas sintomáticas e assintomáticas. Sendo que esse fungo pode ser tanto um agente causal primário de doença, um invasor secundário ou um endófito. Neste presente trabalho, procedeu-se ao isolamento de fungos endofíticos de sementes de duas populações de *Zea mays* (BR105 e BR106). Dentro das diferentes linhagens de milho ensaiadas, encontrou-se *Fusarium* em uma freqüência que variou de 0 a 100% em relação ao total de fungos isolados. A análise molecular dos isolados foi realizada utilizando-se a técnica de RAPD. Foram analisadas 21 linhagens de *F. moniliforme* usando-se 10 iniciadores aleatórios da Operon Technologies (Kit X). Observou-se uma variabilidade genética entre os isolados endofíticos de *F. moniliforme*, analisados por RAPD. Esses isolados puderam ser agrupados por local de isolamento. Também foi observada uma relação entre os isolados, as linhagens de sementes e a população de milho ensaiada. Essa relação ocorreu de forma parcial, tendo sido mais evidente nos isolados de um local do que no outro. Objetivando-se estudar a base molecular da patogenicidade e especialização ao hospedeiro em isolados endofíticos de *F. moniliforme*, desenvolveu-se um sistema de transformação

genética baseado no gene da nitrato redutase de *Fusarium oxysporum*. Foram obtidas frequências de transformação que variaram de 30 a 60 transformantes por μg de DNA. Objetivando-se ainda um futuro monitoramento de linhagens endofíticas em milho, bem como uma utilização das mesmas como portadores de genes para a transformação genética de plantas, obteve-se linhagens marcadas com o gene da enzima GUS. A observação da expressão do gene em questão em um transformante no interior da raiz de milho, foi realizada com sucesso. Neste trabalho também foi observada a transposição genética do elemento *Impala* de *F. oxysporum* em *F. moniliforme*.

VARIABILITY, GENETIC TRANSFORMATION AND TRANSPOSONS
IN ENDOPHITIC STRAINS OF *Fusarium moniliforme* ISOLATED FROM
MAIZE (*Zea mays* L.).

Author: JOÃO ALENCAR PAMPHILE

Adviser: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY:

The *Fusarium moniliforme* specie is often found in seeds of mayze and this it is the possible way of inoculum in field. *Fusarium* spp. are associated with sintomatics and assintomatics plants. This fungi can be found as a primary causal agent of disease, a secondary invader or an endophyte. In the present work, endophytic fungi was isolated from two populations of *Zea mays* (BR 105 and BR 106). In differents strains of mayze assessed, *Fusarium* have been found in a range frequency of 0 to 100% in relation with the total isolated fungi. The molecular analysis of isolates was perfomed using RAPD technique. Twenty-one *F. moniliforme* strains were analised using ten randomic primers Operon Technologies (Kit X). A genetic variability between endophytics strains have been observed by RAPD. Such strains were clustered by local origin. The association between strains, seeds lines and mayze population, also were possible. The clustering was partial, and were more evident in strains from on place than another. With the aim of to study the molecular basis of pathogenicity and specialization of *F. moniliforme* endophitic strains to host, was developed a system of genetic transformation based on nitrate reductase gene of *Fusarium oxysporum*. Transformation frequencies of 30 to 60 transformants per μg DNA

was acquired. With the aim of a future monitoration of endophytic strains in mayze, as well as his use as a vector of genetic transformations of plants, marked strains were obtained with the GUS gene. The observation of gene expression in a transformant into mayze roots, was made successfully. In that work, the genetic transposition of *Impala* element of *F. oxysporum* in *F. moniliforme* was also observed.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são aqueles que ocorrem no interior de plantas e, pelo menos aparentemente, não produzem sintomas de doenças nos hospedeiros, embora possam vir a fazê-lo em outro estágio do seu ciclo de vida ou sob uma condição específica.

A espécie *Fusarium moniliforme* é encontrada freqüentemente em sementes de milho, sendo essa possivelmente a sua forma de inóculo no campo. *Fusarium* spp. são associadas com plantas sintomáticas e assintomáticas. Sendo que esse fungo pode ser tanto um agente causal primário de doença, um invasor secundário ou um endofítico.

O milho é uma cultura de grande importância sócio-econômica tanto para o Brasil, quanto para o mundo em geral. É usado diretamente na alimentação humana e de animais domésticos, vindo ainda a ser matéria prima de inúmeros produtos industrializados.

Este trabalho teve como objetivo inicial verificar se ocorria uma coevolução entre os isolados endofíticos de *Fusarium* sp. e o milho, isto é, se os isolados endofíticos poderiam ser agrupados de acordo com a linhagem de milho

da qual tenham sido obtidos. Uma outra hipótese a ser testada seria a de que o local influenciaria a distribuição de fungos endofíticos na planta. Com esses objetivos, realizou-se a análise molecular dos isolados via RAPD.

Objetivando-se estudar a interação endófito-planta, bem como a utilização dos endófitos como hospedeiros de genes para a transformação de plantas, procurou-se desenvolver um sistema de transformação genética. Em vista disso, escolheu-se o sistema da nitrato redutase. Esse sistema está muito bem estabelecido em uma outra espécie do gênero *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*), além do que, a obtenção de mutantes para a nitrato redutase poderia ser feita sem a utilização de agentes mutagênicos, o que preservaria o genoma dos fungos de alterações indesejáveis.

Completada a etapa supracitada, procurou-se empregar um sistema de transformação genética que permitisse a visualização da expressão de um gene exógeno no fungo endofítico na planta hospedeira, permitindo um futuro monitoramento e estudo ecológico desses endófitos transformados no hospedeiro. Assim sendo, desenvolveu-se um sistema de transformação genética utilizando-se o gene *gusA* de *Escherichia coli*.

Em uma quarta etapa, com o objetivo de se desenvolver uma ferramenta para a clonagem gênica, trazer uma contribuição à possibilidade de transferência horizontal de genes, bem como um futuro emprego de endófitos na transformação genética de plantas, procurou-se estudar a transposição genética de um elemento transponível de *F. oxysporum* em uma linhagem endofítica de *Fusarium moniliforme* isolada de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos endofíticos

2.1.1. Definição

Microrganismos endofíticos são aqueles que ocorrem no interior das plantas especialmente em suas partes aéreas e não produzem qualquer efeito fenotipicamente detectável nas plantas. São principalmente os fungos e as bactérias, sendo que os mesmos são encontrados em todos os vegetais superiores estudados até o momento.

Segundo ESPINOSA-GARCIA & LANGENHEIM (1990), os fungos endofíticos tem sido caracterizados por sua capacidade em produzir infecções aparentemente inócuas em tecidos de plantas. Segundo HAWSWORTH *et al* (1983), fungos endofíticos são simbioses que vivem no interior de tecidos vegetais sem distinção quanto à posição dos mesmos. De acordo com Carrol (1986) citado por ESPINOSA-GARCIA & LANGENHEIM (1990), o termo endofítico é aplicado exclusivamente aos organismos que colonizam o interior dos tecidos das partes aéreas das plantas. Conforme SIEBER *et al* (1988), a maioria dos fungos endofíticos aparentemente apresentam uma relação neutra, são simbioses facultativos que podem crescer, em meio de cultura, a partir do

interior de órgãos vegetais submetidos à desinfecção externa, tais órgãos não apresentando, em geral, a aparência de serem portadores desses fungos. Essa definição de endofíticos como aqueles organismos que não apresentam sintomas no hospedeiro também foi utilizada por FISHER *et al* (1986) em um trabalho sobre a ocorrência de endofíticos em *Ulex*.

WHITE & COLE (1986), consideraram fungos endofíticos como aqueles que ocorrem dentro dos tecidos de plantas, independentemente da natureza dessa associação. Apesar disso, esses autores consideraram os vários aspectos dessa relação fungo/planta, destacando-se episódios onde esses fungos ocorriam como parasitas facultativos em coníferas. Os mesmos autores também afirmaram que os endofíticos encontrados em forrageiras, incluindo *Lolium temulentum* L., *L. perene* L. e diversas espécies de *Festuca*, não eram nem parasitas facultativos, nem saprófitas, mas endossimbiontes obrigatórios, os quais mantinham uma relação intercelular com as partes aéreas das plantas. Nesses casos, os fungos foram inicialmente isolados de folhas, hastes e sementes de *Festuca subulata* e *Lolium perene* e identificados como *Acremonium* Link. seção *albo-lanosa*. Aparentemente, tais fungos estavam relacionados com a forma teleomórfica do ascomiceto *Epichloe*. Esses autores acrescentaram ainda que a presença de hifas endofíticas em forrageiras e a ausência de corpos de frutificação visíveis na parte externa do hospedeiro, poderiam representar a perda temporária ou permanente de produzi-los.

Acerca das características biológicas da relação fungo/hospedeiro, segundo WHITE (1988), pode-se encontrar três tipos de associação. No tipo 1, ocorre a formação de estroma por parte dos fungos na maioria das plantas infectadas. Esse tipo de infecção é encontrado em diversas

subfamílias de forrageiras. Em um tipo 2 de associação, a formação de estroma é pouco observada quando se analisa um grande número de hospedeiros infectados. Já na associação do tipo 3 nunca se observa a formação de estromas. Os dois últimos tipos de associações foram observados na subfamília festucoideae.

WHITE (1988), considerou que ocorreu evolução conjunta entre o fungo endofítico *Epichloe* spp. e certas gramíneas forrageiras. Esta relação evoluiu a partir de uma associação inicialmente patogênica para uma associação mutualística, possivelmente por tais plantas terem desenvolvido a capacidade de suprimir a formação de estroma pelos endofíticos. O mecanismo para a supressão do estroma estaria relacionado com a produção de alcalóides que atuariam sobre o fungo.

Segundo WHITE (1992), os endofíticos clavicipitaceous devem possuir um impacto significativo na ecologia das plantas hospedeiras. Esses fungos tem sido associados com toxicoses em mamíferos herbívoros (BACON *et al.*, 1977; FLETCHER & HARVEY, 1981), aumento na resistência à insetos (CLAY, 1988), aumento na resistência à doenças causadas por fungos (STOVALL & CLAY, 1991), e tolerância à seca (WEST *et al.*, 1990).

2.1.2. Especificidade dos organismos endofíticos às plantas

Associações com endofíticos devem variar de um maior contato, onde os fungos habitam os espaços intercelulares e o xilema na planta, para uma colonização mais ou menos superficial dos tecidos periféricos. Em populações

naturais de espécies de plantas saudáveis, uma série de fungos que são geralmente considerados muito específicos para o hospedeiro correspondente, tem sido consistentemente encontrada nas comunidades de endofíticos. Exemplos desses incluem o *Hypoxylon fragiforme* (Pers.:Fr.) Kickx e *Apiognomonia errabunda* (Rob.) Hohnel em *Fagus sylvatica* L. na Europa (CHAPELA & BODDY, 1988) e em *Fagus grandifolia* Ehrh. na América do Norte (CHAPELA, 1989), diversas espécies de *Leptostroma* em coníferas (SIEBER, 1988; PETRINI *et al.*, 1989) e um número de patógenos conhecidos como por exemplo *Fusarium* spp. em algumas culturas (SIEBER *et al.*, 1988; LESLIE *et al.*, 1990). Em geral, um largo número de endofíticos pode ser isolado de espécies simples de plantas, mas somente poucos *taxa* de fungos são dominantes em cada hospedeiro e podem ser considerados específicos. Como eles aparentemente não colonizam hospedeiros em outras famílias de plantas, sua ocorrência freqüentemente está limitada a somente um ou poucos hospedeiros fortemente relacionados taxonomicamente (PETRINI, 1986).

SIEBER *et al* (1988), elaboraram um estudo interessante em trigo, abordando quatro aspectos distintos: 1) comparando as relações do endofítico *Septoria nodorum* em quatro diferentes variedades de trigo de inverno; 2) registrando a ocorrência desses fungos em trigo; 3) comparando as populações de fungos endofíticos em lugares com diferentes condições climáticas e, por fim, 4) comparando a freqüência de isolados em diferentes órgãos de plantas. As espécies de fungos mais freqüentemente isoladas a partir de raízes, colmo, folhas, glume e sementes foram agrupadas em quatro grupos. No primeiro, estão aqueles patogênicos bem conhecidos e economicamente importantes como *Septoria nodorum*, *Didymella exitialis*, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. nivale* e *Rhizoctonia solani*. No segundo grupo, estão os saprófitas primários, os quais são

capazes de causarem danos às plantas em condições especiais, exemplo: *Cladosporium oxysporum*, *Alternaria tenuissima* ou *Epicoccum purpurascens*. No terceiro grupo estão os patógenos de menor importância, tais como *Idriella bolleyi*. Finalmente, no quarto grupo encontram-se espécies que, ocasionalmente, estão presentes somente em trigo.

Tem sido evidente por estudos descritivos que um certo grau de especificidade foi envolvida no estabelecimento de endofíticos em populações de plantas. Então, listas de espécies obtidas para um dado hospedeiro são mais ou menos características, com poucas taxa específicas estritamente ao hospedeiro. Nos últimos anos, análises de ordenamento de comunidades tem mostrado que comunidades de endofíticos são usualmente específicas aos hospedeiros ao nível de espécies. PETRINI (1985) demonstrou que espécies "ericaceous" crescendo no mesmo local são geralmente colonizadas por comunidades distintas de endofíticos. Em um estudo de fungos endofíticos de *Pinus sylvestris* L. e *Fagus sylvatica* crescendo no mesmo local, PETRINI & FISCHER (1988) provaram que comunidades distintas de fungos colonizam os dois hospedeiros. Esses resultados foram confirmados por PETRINI & FISCHER (1990) em um modelo diferente. O trabalho de SIEBER *et al* (1991) também fornece evidências para a hipótese de que cada espécie de planta desenvolve uma comunidade de endofíticos altamente específica.

Métodos usados para o estabelecimento da especificidade aos hospedeiros pelos endofíticos inclui investigações ecológicas das comunidades de endofíticos pelo isolamento e trabalho de censo, medidas diretas dos esporos e outros estudos morfológicos, eletroforeses de isoenzimas e, mais recentemente, análises de DNA, como também experimentos de germinação.

WHITE JR (1992), realizou um estudo sobre associações endofítico-hospedeiro em forrageiras. Ele separou isolados de *Acremonium typhinum* em variedades distintas, baseado em aspectos ecológicos, fisiológicos e morfológicos. Ele considera que a formação do estroma de isolados de *A. typhinum* está fortemente adaptada às plantas hospedeiras. Embora o grau de especificidade na relação fungo-hospedeiro não esteja clara, diferenças na capacidade de crescimento dos isolados nos diferentes hospedeiros, quando crescidos em açúcares, sugere diferenças nos hospedeiros. Esses hospedeiros devem prover barreiras fisiológicas que evitam que esses fungos produzam estroma com sucesso em plantas nas quais os mesmos não estão adaptados.

Geralmente um grande número de taxa de fungos pode ser isolada de tecidos de espécies hospedeiras (PETRINI, 1986; SIEBER *et al.*, 1988; PETRINI *et al.*, 1989). Contudo, em todas as espécies de plantas investigadas, um padrão distinto de dominância por somente um ou poucos taxa de fungos pode ser detectado. Por exemplo, *Lophodermium piceae* (Fuckel) Hohn. é o endofítico mais freqüente de *Picea abies* Karst. (SIEBER, 1988). PETRINI *et al* (1989) tem encontrado que *Phyllosticta multicorniculata* é o mais importante colonizador de *Abies balsamea* (L) Mill. A presença de endofíticos específicos ao hospedeiro em *Alnus rubra* Bong. tem sido demonstrado por SIEBER *et al.* (1991) em um estudo para o isolamento de endofíticos potencialmente patogênicos para serem usados em programas de biocontrole. PEREIRA *et al* (1993), isolaram 13 espécies endofíticas de folhas de *Stylosanthes guianensis*, a maioria deles sendo isolados raros e somente *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp., e *Xylaria* sp. estavam presentes em pelo menos quatro das nove amostras analisadas.

2.1.3. Aplicações biotecnológicas

Basicamente os microrganismos endofíticos podem ser usados em dois campos principais: no controle de pragas e doenças e como vetores / hospedeiros para transformação genética de plantas.

2.1.3.1. Controle de pragas e doenças

Muitos endofíticos são capazes de produzir componentes antibióticos em cultura e que são ativos contra bactérias patogênicas de plantas e homens como também outros fungos. A função primária da produção de antibiótico deve ser a da competição contra antagonistas.

Prestige *et al* (1982) citados por MURRAY *et al* (1992), demonstraram por intermédio de estudos com forrageiras infectadas e não infectadas com endofíticos que a presença dos mesmos confere proteção às plantas por danos causados por *Listronotus bonariensis*. FANNIN *et al* (1990), confirmam que a presença do fungo endofítico *Acremonium lolli* na forrageira *Lolium perenne* tem sido associada à resistência de plantas infectadas ao ataque de *Listronotus bonariensis*. Os autores destacam ainda que a produção nas plantas infectadas do alcalóide peramina é sabida por ser largamente responsável por essa resistência. BREEN (1992), destaca a resistência dessa planta forrageira à *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) causada pelo *Acremonium*.

HALLMAN & SIKORA (1996) demonstraram que um isolado endofítico não patogênico de *F. oxysporum*, isolado de raízes de tomate, produzia

metabólicos que inibiam o crescimento do nematóide parasita *Meloidogyne incognita*. Esses autores destacam que *F. oxysporum* era o endófito mais freqüentemente isolado de plantas de tomate.

No controle biológico de pragas de culturas, FAHEY (1988) descreve um sistema de proteção às culturas utilizando uma bactéria endofítica, *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* transformada com um gene codificante para a produção de uma proteína letal aos insetos (alfa-endotoxina) de *Bacillus thuringiensis*.

A bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* descrita inicialmente por DAVIS *et al* (1984), é comumente encontrada na natureza onde coloniza o sistema vascular da forrageira *Cynodon dactylon* L. (LIAO & CHEN, 1981; DAVIS & AUGUSTIN, 1984; TESTER, 1992). Segundo TESTER (1992), essa bactéria endofítica não sobrevive naturalmente fora da planta hospedeira, não persiste acima de 18 dias em resíduos de milho incorporados no solo e não é transmitida pela semente. A habilidade de viverem dentro somada à inabilidade de viverem fora das culturas alvo, constituiu um critério para a seleção de microrganismos para a coleção da InCide Company de biopesticidas (FAHEY, 1988).

Segundo FAHEY (1988), diversas são as vantagens da utilização de sistemas que usam microrganismos endofíticos no controle de pragas sobre os pesticidas convencionais, incluindo:

Vantagens Econômicas.: Aplicação única, onde a inoculação de semente ou a inoculação de plantas jovens com um endofítico apropriado resulta

na colonização dessa planta. Os endofíticos vivem no interior da planta e são então protegidos do ambiente externo. Produtos biológicos e químicos aplicados externamente são desprotegidos e muitas vezes requerem aplicações múltiplas.

Dosagem pequena, pois a aplicação de endofíticos pode ser realizada com somente quantidades mínimas de bactéria por acre (miligramas). Após a aplicação, endofíticos multiplicam-se dentro de cada planta onde então o passo final da fabricação ocorre após o ponto de venda. Químicos convencionais aplicados externamente são geralmente aplicados em grandes áreas.

Potência sustentada, considerando-se que os endofíticos podem produzir o agroquímico desejado por toda a vida da planta, enquanto produtos aplicados externamente são adversamente afetados ou tornam-se ineficazes pelo ambiente e pelo crescimento subsequente da planta.

Vantagens Ambientais.: Atividade contida, pois os endofíticos sobrevivem e funcionam somente dentro da planta que eles protegem ou melhoram, enquanto produtos aplicados externamente são amplamente dispersados cada vez que são aplicados.

Dependência da planta, levando-se em consideração que endofíticos, por natureza, não sobrevivem fora da planta e portanto não se multiplicam ou se espalham no ambiente ou permanecem ativos após a colheita. Microrganismos aplicados externamente devem sobreviver no ambiente para serem efetivos.

Sem resíduos tóxicos, levando-se em conta que os produtos endofíticos podem ser considerados ambientalmente inócuos e degradáveis. A maioria dos pesticidas aplicados externamente devem resistir à degradação para serem efetivos.

Vantagens tecnológicas. Certos produtos endofíticos devem ter as seguintes vantagens tecnológicas sobre plantas melhoradas geneticamente:

Um desenvolvimento rápido: mudar a genética dos microrganismos é um processo mais rápido e simples do que mudar a genética das plantas.

Uma comercialização do produto cedo: o desenvolvimento de produtos baseados em endofíticos não requer programas de melhoramento de plantas (que requerem muitos anos).

Uma ampla aplicabilidade: produtos baseados em endofíticos podem funcionar em uma ampla faixa de variedades úteis comercialmente de culturas alvo.

Rendimento: endofíticos tem um impacto mínimo na fisiologia da planta hospedeira (i.e. pouco ou nenhum efeito no rendimento, vigor ou qualidade). Em muitos casos, a alteração na genética das plantas pode reduzir substancialmente o rendimento.

Vendas repetidas: muitos endofíticos não são transmitidos via sementes e portanto os fazendeiros vão ter que comprar produtos baseados nesses

organismos a cada estação. Novas variedades de plantas normalmente possuem oportunidades repetidas de venda somente quando a semente comprada é um híbrido.

Avaliando-se o impacto ecológico da utilização de microrganismos modificados geneticamente na agricultura, deve-se ressaltar que, segundo TURNER *et al* (1991), o uso de técnicas de DNA recombinante com o intuito de obter produtos microbiais para a agricultura tem focado atenção no risco de avaliação de microrganismos geneticamente engenheirados. Acerca desses componentes muito importantes do risco de avaliação estão dispersão, persistência, atividade biológica e estabilidade genética. Alguns micróbios recombinantes devem ser incapazes de persistir por longos períodos de tempo, devido às condições ambientais, no sítio de dispersão. Alternativamente, se um micróbio alterado geneticamente sobrevive em um estresse físico, químico e biológico ou é dispersado para um nicho mais favorável, então a atividade biológica e a estabilidade genética do organismo tornam-se fatores chave na avaliação dos riscos ambientais associados com a soltura.

TURNER *et al* (1991), considerando-se o tópico supracitado, estudaram a forma com que a estabilidade genética de construções da bactéria endofítica *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* poderia ter potencialmente um impacto tanto na eficácia do biopesticida quanto nos riscos ambientais. Nesse trabalho, os autores analisaram tanto a deleção de seqüências do gene inserido quanto as ramificações ecológicas de cada deleção.

2.1.3.2. Portadores / hospedeiros para transformação genética de plantas

Sobre a utilização de microrganismos endofíticos, mais propriamente dito fungos endofíticos, como portadores/ hospedeiros de genes para a transformação genética de plantas, como ainda encontra-se incipiente, há de se destacar o trabalho pioneiro e portanto básico, até então único na área, em que utilizou-se um fungo endofítico como vetor para esse fim.

MURRAY *et al* (1992), usaram o fungo endofítico *Acremonium* modificado geneticamente, para transformarem o centeio *Lolium perene*.

O primeiro passo dos autores foi o de escolherem uma linhagem de *Acremonium* que não produzisse uma doença específica no gado (que pastavam no campo que continha essas forrageiras "infectadas" pelo endófito *Acremonium lolli*) associada a uma desordem nervosa. Desordem nervosa essa causada pela produção de lolitrems pelo fungo sob certas condições ambientais na pastagem. Dessas neurotoxinas, a que se destacava nas forrageiras, por ser a única encontrada nas mesmas, era a lolitrem B. Os autores isolaram e identificaram uma linhagem que não produzia níveis detectáveis dessa proteína, a linhagem 187BB.

O passo seguinte foi o desenvolvimento de um sistema de transformação com alta eficiência para a linhagem selecionada de *Acremonium* sp. 187BB, usando os plasmídios pAN7-1 e pNOM-2 que carregavam um gene para a resistência à higromicina (*hph*) e B-glucoronidase (*uidA*) respectivamente, sob controle de seqüências 5' e 3' de *A. nidulans*.

Os autores usaram uma modificação do procedimento de Vollmer & Yansky (1986) citados por MURRAY *et al* (1992). Em seguida os autores passaram à análise dos conídios, onde após uma seleção inicial em meio batata-dextrose (BDA) mais higromicina (200 µg/ml), os transformantes foram transferidos para MC sem higromicina por 4-5 semanas para esporulação. Os conídios foram coletados e plaqueados. Após 12-14 dias, o micélio de 25 conídios germinados foi transferido para meio BDA + higromicina e analisados quanto à resistência à higromicina.

Para o passo de crescimento e infecção das plantas, os autores utilizaram a linhagem selvagem e os transformantes. Eles infectaram as plântulas fazendo uma inserção do micélio em um corte profundo longitudinal na junção do mesocótilo e coleótilo. As plântulas cresceram em cultura axênica por 10-15 dias e foram transferidos para uma mistura esterilizada de areia e turfa e alocados em casa de vegetação. Após 10 semanas os fungos foram reisolados das folhas.

Os autores ainda realizaram análises dos transformantes quanto ao estudo do DNA genômico e cromossomos no que se refere à caracterização da integração dos plasmídios, bem como análises qualitativas e quantitativas da expressão da β -glucuronidase nos fungos transformados e reisolados como também dos transformados que foram infectados na planta (análise da expressão dentro da folha).

2.2. *Fusarium* spp.

Segundo a revisão de DOMSCH et al (1980), o gênero Hyphomycete *Fusarium* é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida com um micélio aéreo e difuso ou esporulação esporodoquial. A maioria das espécies de *Fusarium* são fungos de solo com distribuição cosmopolita e são ativos na decomposição de substratos celulósicos das plantas, sendo que algumas espécies são parasitas das plantas. Em algumas espécies, as linhagens patogênicas hospedeiro-específicas são distinguidas das *formae speciales* que por outro lado não diferem das linhagens saprofíticas das mesmas espécies. A patogenicidade ao homem é rara, mas muitas espécies causam o apodrecimento de estoques e são importantes produtoras de toxinas.

As duas principais formas dos esporos de *Fusarium* são os macroconídios e microconídios. Os microconídios são unicelulares e uninucleados; os macroconídios mais comuns são multicelulares, mas cada célula tem somente um núcleo. Todos os núcleos de um macroconídio, contudo, são descendentes mitóticos de um mesmo núcleo progenitor e são portanto geneticamente idênticos. (PUHALLA, 1981).

Segundo PUHALA (1981), os estágios sexuais de *Fusarium* são ascomicetos; o esporo sexual é o ascósporo. Alguns estados perfeitos tem ascósporos bicelulares e são agora alocados ao gênero *Nectria*. Cada célula de um ascósporo bicelular é uninucleada, e ambos núcleos são geneticamente idênticos. Outros estados perfeitos, como em *Gibberella*, formam ascósporos multicelulares.

Uma cultura de *Fusarium* recém isolada da natureza deve se manter inalterada por repetidas subculturas em ágar, ou deve mudar sua morfologia gradualmente, ou deve produzir repentinamente setores de crescimento radicalmente diferente na aparência do parental. Essa variabilidade morfológica não tem causado fim à controvérsia na classificação das espécies de *Fusarium*. Variantes de uma espécie são às vezes morfológicamente indistinguíveis de membros de uma outra espécie. Claramente, uma investigação da variação em *Fusarium* é essencial para uma caracterização do gênero. (PUHALLA, 1981).

Conforme PUHALLA (1981), estudos da variação morfológica em *Fusarium* são conflitantes e freqüentemente confusos, mas certas generalizações sobre essa variação podem ser feitas: (i) nem todos isolados são variáveis, e alguns isolados são mais variáveis do que outros. (ii) As mudanças não são contínuas e ocorrem em passos discretos. A alteração morfológica, contudo, deve ser tão pequena que não é notada até pelo mais astuto observador. A mudança morfológica pode ocorrer como setores ou “pegadas” na colônia parental, ou deve aparecer entre a progênie de esporos em uma colônia aparentemente normal. (iii) As alterações morfológicas estão normalmente limitadas à perda do micélio aéreo, um aumento na produção de macroconídios, e às vezes, um aumento da pigmentação. (iv) Esses variantes são na maioria estáveis e podem ser perpetuados por transferência de microconídios ou hifa.

Isolados naturais de certas espécies de *Fusarium* patogênicas às plantas mostram diferenças significantes na patogenicidade. Esses isolados entram em grupos cujos membros podem atacar somente certas espécies de plantas. Snyder & Hansen (1940) chamaram esses grupos de “formae speciales”.

Freqüentemente as *formae speciales* podem ser adicionalmente subdivididas em “raças fisiológicas” que atacam somente certos cultivares de uma espécie particular de planta. Em geral, isolados de diferentes *formae speciales* são morfológicamente indistinguíveis. (PUHALLA, 1981).

De acordo com PUHALLA (1981), procedimentos tem sido propostos para prevenir a variabilidade de *Fusarium* em culturas de estoque. A manutenção em solo esterilizado ou agar extrato solo, estocagem em baixa temperatura, e transferência do estoque por uma única hifa ou microconídio também tem sido sugerido para reduzir a variação. Esses procedimentos são efetivos, e devem promover indícios adicionais como a base da variação.

Existem relatos de que a planta hospedeira ou seus metabólitos podem alterar isolados de *Fusarium*. Em 1958, Buxton reportou um extraordinário experimento. Conídio da raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, inibido pelo exudato da raiz do cultivar de ervilha Alaska resistente, foi incubado por duas semanas no exudato e então permitiu-se que crescesse em meio livre de exudato. Alguns indivíduos da progênie foram então capazes de atacar Alaska. Essa alteração na virulência foi estável em culturas vegetativas. As implicações desses resultados são profundos. Se *Fusarium* pode na verdade adquirir nova especificidade a hospedeiros tão certamente, esse fato deve ser considerado por ambos, patologistas de plantas e melhoristas. (PUHALLA, 1981). O autor ainda destaca que esse estudo realizado por Buxton foi único e incompleto e deve ser verificado.

2.2.1. *Fusarium moniliforme*

O estado assexual (imperfeito), *Fusarium moniliforme*, inicialmente descoberto por Sheldon (1940), pertence à ordem Moniliares, família Tuberculoriaceae e seção Liseola. O estado sexual (perfeito) de *F. moniliforme*, inicialmente descrito por Wineland (1924) como *Gibberella moniliformis*, pertence à Ascomycotina (pyrenomycetes), ordem Hypocreales e família Nectriace. O estado sexual de *G. moniliformis* foi modificado mais tarde para *Gibberella fujikuroi* (Sarw.) Wr. (SIDHU, 1988).

Segundo a revisão de DOMSCH (1980), a temperatura ótima de crescimento de *F. moniliforme* é entre 22,5 e 27,5°C, o máximo 32-37°C e o mínimo entre 2,5 e 5,0 °C, sendo que também tem sido relatado a ocorrência de um pequeno crescimento a 6°C e nenhum a mais de 30°C. A humidade mínima para o crescimento vegetativo é de -180 bars de potencial de água, com a germinação do conídio ocorrendo entre a saturação de vapor e -140 bars; o potencial osmótico ótimo é em torno de -10 bars mas nenhum crescimento ocorre em -150 bars. Uma boa utilização das seguintes fontes de carbono tem sido reportadas: glucose, mannose, galactose, frutose, rhamnose, arabinose, xylose, ribose, sucrose, maltose, amido, sorbitol, mannitol, lactato, e gluconato; um crescimento moderado é obtido com rafinose e glicina como únicas fontes de carbono e nitrogênio. Fases de crescimento em fermentadores de culturas e em várias condições nutricionais tem sido extensivamente estudadas; crescimento similar à leveduras é observado em vários meios líquidos a 25°C sob agitação. A produção de micélio é estimulado significativamente por íons de ferro e zinco, e tiamina, biotina ou inositol; para um crescimento máximo 0.095 de fósforo e 0.013% de enxofre são requeridos no meio. A esporulação é promovida pela luz

(12:12 h luz: escuro a 20-23°C) e a produção de macroconídios deve ser induzida por “luz escura”. A esporulação em condições submersas ocorre em meio contendo sucrose. *F. moniliforme* tolera 10% de CO₂ mas 20% de CO₂ na atmosfera reduz o crescimento *in vitro* em 15%. Atividades de amilase e inulase são encontradas na fração microsomal. Existem relatos da produção de galactose oxidase, 1,6-β-glucanhydrolase, dextranase, pectinases, ácido glutâmico decarboxylase, fosfatases ácidas, penicilina V-acylase, ribonuclease e fenol oxidase. Diversos polifenóis são utilizados. Uma enzima celulolítica também foi encontrada em sementes de milho inoculadas com esse fungo; *F. moniliforme* causa uma perda marcante em têxteis, utiliza celulose de algodão, papel de filtro e celulose bacteriana com uma forte atividade em pH 5,5. Ele não hidrolisa fructosan de *Aspergillus sydowii* mas converte os de *Acetobacter* sp. a *Bacillus subtilispumilus* muito bem. *F. moniliforme* também pode atacar lã. Um complexo de proteínas lembrando renina foi encontrado em culturas líquidas. A degradação do herbicida simazine, N-dealquilação do grupo allylamino em atrazine e do acaricida chlorphenamidin tem sido demonstrado *in vitro*. Cortisol é convertido para o seu derivado dehidro. Os hidrocarbonos decano, hexadecano e parafina são oxidados. Em soluções nutricionais originalmente sem aminoácidos, alanina e ácido glutâmico em conjunto com traços de glicina, lisina, treonina e valina foram encontrados, bem como ácido glucurônico, glucose, galactose e manose; uma substância com propriedades morfogênicas em outros fungos ocorre em culturas envelhecidas. *F. moniliforme* produz ácido fusárico em quantidades variadas, ácido fusarinólico, ácido indole-3-acético e também ácidos giberélicos e seus precursores e derivativos, sendo que a biossíntese das giberelinas é promovido pela luz. Uma supressão do crescimento das raízes tem sido observado em trigo mas não em aveia. A liberação de escopoletina de raízes de aveia foi, contudo, induzida e o crescimento de cevada foi parcialmente estimulada ou parcialmente

retardada. O fungo suprime o crescimento de *Chalara elegans*, *Gaeumannomyces graminis* e *Rhizoctonia bataticola in vitro*. A produção de substâncias tóxicas em patinhos jovens, embriões de galinha, mamíferos ou componentes com propriedades eméticas tem sido relatadas. Casos de queratiníase no homem e paralisia dos membros em porcos e aves domésticas causado por *F. moniliforme* tem sido relatado. Ele é capaz de crescer em condições anaeróbicas e tolera mais de 15% de NaCl no meio, correspondendo a cerca de -145 bars de potencial osmótico.

2.3. Variabilidade genética: mutação

Como para todos os seres vivos, e os fungos não constituem exceção, qualquer estudo de Genética e Melhoramento só é possível se existir variabilidade genética. A variabilidade existente dentro de uma espécie é que permite que indivíduos com diferentes características genéticas possam ser analisados e aqueles mais apropriados sejam selecionados. A mola mestra dessa variabilidade é a mutação, isto é, uma alteração no material genético e que é transmitida aos descendentes (AZEVEDO, 1995). É devido a isso que os fungos mais bem estudados geneticamente apresentam um enorme número de mutantes obtidos espontaneamente ou induzidos por agentes mutagênicos (AZEVEDO, 1976).

Em *Fusarium*, diversos mutantes foram obtidos, seja com o uso de mutagênicos (PUHALLA & SPIETH, 1983), seja naturalmente, com o isolamento de mutantes espontâneos (PUHALLA & SPIETH, 1985; CORREL *et*

al, 1986; PUHALLA, 1985; VENTER *et al*, 1992; CORRELL *et al*, 1987; KLITTICH & LESLIE, 1988; LAMONDIA & ELMER, 1989os quais têm sido empregados largamente em experimentos diversos, seja na identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (V.C.G.s), seja no desenvolvimento de sistemas de transformação genética, seja na clonagem gênica: mutantes para a utilização do nitrato (*nia⁻*).

O crescimento de linhagens selvagens é restrito no clorato, presumidamente porque o clorato é reduzido pela nitrato redutase ao clorito que é altamente tóxico. Os mutantes que não utilizam o nitrato são incapazes de reduzir o clorato à clorito sendo portanto resistentes ao clorato (CORRELL *et al*, 1987).

A via da redução do nitrato tem sido bem caracterizada tanto em *Neurospora crassa* quanto em *A. nidulans*. Esses dois fungos requerem somente duas enzimas para reduzir o nitrato à amônia: nitrato redutase, que converte o nitrato à nitrito, e a nitrito redutase, que reduz o nitrito à amônia (Figura 2.1). Numerosos genes, contudo, controlam o processo de assimilação do nitrato nesses fungos (pelo menos 11 genes em *A. nidulans* e 8 em *N. crassa*), e sua regulação é complexa. Em geral, os genes necessários para a assimilação do nitrato em *Aspergillus* e *Neurospora* parecem ser similares em função. Por exemplo, ambos polipeptídeos estruturais da nitrato e nitrito redutases são codificados por genes únicos nesses fungos. Ambos fungos também requerem diversos genes (pelo menos 5 em *A. nidulans* e 4 em *N. crassa*) para a síntese do cofator contendo molibdênio que é parte do complexo da nitrato redutase. Esse cofator é também essencial para a atividade da purina desidrogenase; no catabolismo da via da purina, purina dehydrogenase hydroxylates hypoxantina. Em adição à esse locus estrutural, dois loci são conhecidos em *A. nidulans* e *N. crassa*. O produto do

locus regulatório da assimilação do nitrato controla a indução da nitrato redutase e nitrito redutase. Um segundo locus, o principal locus regulatório do nitrogênio, reprime a síntese de ambos nitrato redutase e nitrito redutase sempre que uma fonte de nitrogênio preferencial como amônio ou glutamina está presente (CORREL *et al*, 1987).

Figura 2.1. Via da Utilização do Nitrato em *A. nidulans* e *Neurospora crassa* (CORRELL *et al*, 1987).

DABOUSSI *et al* (1991), trouxeram maiores informações sobre a regulação do gene da nitrato redutase. Estudando a expressão heteróloga do gene *nir A* de *A. nidulans* em *F. oxysporum*, indicaram que a proteína *nir A* de *A. nidulans* é muito provavelmente um fator de transcrição que deve se ligar à seqüência de genes estruturais e iniciar a transcrição, sendo que essas seqüências alvo devem ser similares tanto em *Fusarium* quanto em *Aspergillus*. Os autores verificaram também que o gene *nir* de *F. oxysporum* é capaz de controlar, ao nível transcricional, a expressão do gene estrutural *niaD* de *A. nidulans* quando investigado no contexto genético do *F. oxysporum*.

Consoante KLITTICH & LESLIE (1988), mutantes *nit* espontâneos são úteis como marcadores auxotróficos em testes de

compatibilidade vegetativa. Diferentes isolados são compatíveis vegetativamente (i.e., capazes de formar um heterocário) somente se os alelos de todos os loci de compatibilidade vegetativa são idênticos. Grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) são marcadores ideais para estudos populacionais pois eles ocorrem naturalmente, são fáceis de serem obtidos usando-se mutantes espontâneos *nit*, e devem ser seletivamente neutros.

PUHALLA (1985) classificou 21 linhagens de *F. oxysporum* em testes de compatibilidade vegetativa empregando mutantes *nia*⁻. CORRELL *et al* (1986), também utilizando o mesmo tipo de mutantes, realizaram o ensaio de compatibilidade vegetativa em 199 isolados de *F. oxysporum*.

VENTER *et al* (1992), fazendo uso de mutantes *nia*⁻ relacionaram isolados de *F. oxysporum* de batatas em 6 grupos de VCGs. Os autores também encontraram um complexo padrão de associação entre sintomas de doenças causadas em batatas por *F. moniliforme*, VCG e distribuição geográfica.

Segundo PUHALLA & SPIETH (1983), heterocariose em *F. moniliforme* de milho (Grupo A) é provavelmente rara, em vista da distribuição limitada das células heterocarióticas e por causa da existência de vários genes controlando a incompatibilidade vegetativa. Esses autores ainda esclareceram que possivelmente a heterocariose no grupo C (*F. moniliforme* de arroz) é diferente em relação ao grupo A.

PUHALLA & SPIETH (1985), utilizando mutantes incapazes de reduzir nitrato (mutantes *nit*) obtidos sem a utilização de tratamento mutagênico,

verificaram a incompatibilidade vegetativa entre quatro variedades de *F. moniliforme*: A, B, C e D. Eles verificaram que a incompatibilidade vegetativa, ou de heterocário, ocorria nos quatro grupos. Segundo esses autores, essa incompatibilidade é controlada por genes nucleares (genes *vic*) e é heterogênica e alélica. No grupo A existem pelo menos 10 loci *vic*, 5 no grupo B, 4 no C e 3 no D.

LAMONDIA & ELMER (1989), efetuaram testes de compatibilidade vegetativa em isolados de *F. oxysporum* e *F. moniliforme* que colonizavam tecidos de aspargos. Oito de dezoito isolados de *F. oxysporum* eram únicos e classificados como membros simples de oito VCGs diferentes. De 135 isolados de *F. moniliforme* os autores lograram distribuir 97 isolados dentro de 13 grupos de compatibilidade vegetativa, enquanto 38 não puderam ser classificados em vista do fato de não terem sido obtidos mutantes *nia⁻* (*nitM* e *nit1*) de forma satisfatória.

KLITTICH & LESLIE (1988), examinaram 12 linhagens de *F. moniliforme* quanto à sua habilidade de produzirem setores espontâneos em meio tóxico de clorato. Todas as linhagens deram setores mutantes, sendo que 91% desses eram resistentes ao clorato.

Ainda segundo esses autores, a maioria desses mutantes tinham lesões na via de redução do nitrato (mutantes *nit*). Mutações *nit* ocorreram em sete loci: um gene estrutural para a nitrato redutase (*nit 1*), um gene regulatório específico para a via de redução do nitrato (*nit 3*), e 5 genes controlando a produção do cofator molibdênio. Os autores concluíram que o controle genético da redução do nitrato em *F. moniliforme* é similar ao que ocorre em *Aspergillus* e

Neurospora, embora a regulação geral do metabolismo do nitrogênio deva ser diferente.

Como apresentado no tópico anterior, a mutação constitui a única fonte de variabilidade dos seres vivos, possuindo várias causas. Atualmente, diversas metodologias são adotadas visando-se acessar e estudar a variabilidade natural nos fungos. A maior parte delas baseia-se na utilização de marcadores moleculares, o que passa forçosamente pelo emprego de métodos eletroforéticos.

2.4. Variabilidade genética: marcadores moleculares

Métodos eletroforéticos têm sido utilizados diversas vezes em taxonomia de fungos. Eles têm sido empregados para detectar diferenças associadas aos hospedeiros em isolados de fungos endofíticos. LEUCHTMANN & CLAY (1989) demonstraram uma variação considerável dentro de isolados de *Atkinsonella hypoxylon* (Peck) Diehl de diferentes hospedeiros. Eletroforeses de enzimas pécicas e amilolíticas têm sido usadas com sucesso em isolados de *Leptostroma* por SIEBER-CANAVESI *et al* (1991) visando a detecção de diferenças nos isolados endofíticos relacionadas aos seus hospedeiros.

Marcadores de DNA tem sido usados com sucesso para identificar espécies de fungos ou linhagens intraespecíficas e formação de raças (METZENBERG, 1991). Dentre os marcadores moleculares empregados atualmente, as duas classes que mais se destacam são a dos marcadores RFLP e RAPD.

2.4.1.1. Marcadores RFLP

Por RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) entende-se, em uma tradução livre do termo, o polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). RFLPs resultam de diferenças específicas nas seqüências de DNA (substituições simples de pares de bases, adições ou deleções, ou aberrações cromossomais como as inversões ou translocações) que alteram o tamanho dos fragmentos obtidos por digestão com endonucleases de restrição do tipo II (MICHELMORE & HULBERT, 1987). Os fragmentos de DNA são separados por tamanho por eletroforese em gel de agarose; o DNA é então transferido e imobilizado em um filtro, hibridizado com uma sonda de DNA marcada e visualizado por autoradiografia. O número de bandas observado é dependente do número de loci no genoma homólogos à sonda e ao número de sítios de restrição nessas seqüências de DNA (MICHELMORE & HULBERT, 1987). Ainda segundo MICHELMORE & HULBERT (1987), as análises de RFLP detectam variações nas seqüências de DNA dentro e em regiões contíguas às regiões homólogas à sonda.

MICHELMORE & HULBERT (1987) destacam que o número de marcadores RFLP é efetivamente ilimitado, pois qualquer segmento pequeno clonado de DNA pode ser usado como uma sonda, e diversas enzimas de restrição podem ser usadas para identificar RFLPs com cada sonda.

Em fungos, existem diversos exemplos do emprego de marcadores RFLP. EGGER & FORTIN (1989), realizaram a identificação de fungos ecto-micorrízicos em duas *taxa* diferentes, *Wilcoxina mikolae* e *Wilcoxina rehmii* baseados em RFLPs e na morfologia das culturas. Com o mesmo objetivo de diferenciação de fungos, BRAITHWATE & MANNERS (1989) distinguiram dois tipos de *Colletotrichum* que atacam *Stylosanthes* spp. na Austrália.

JABAJI-HARE *et al.* (1990), analisaram 38 isolados de *Rhizoctonia solani* pertencentes a dez diferentes grupos de anastomoses e de diferentes regiões geográficas. O DNA genômico dos isolados foi hibridizado com sondas homólogas de DNA nuclear de um dos isolados e sondas heterólogas de DNA ribossômico de *Armiilaria ostoyae*. Os resultados mostraram considerável homologia entre seqüências de *R. solani* e genes clonados de RNA ribossômico de *A. ostoyae*, tendo sido observado variabilidade dentro e entre os grupos. Com as sondas homólogas, só houve hibridização com um dos dez grupos de anastomoses, sugerindo que essas sondas sejam seqüências com uma ou poucas cópias por genoma e podem ser usadas para estudos neste grupo específico.

KOHN *et al.* (1988) utilizaram marcadores RFLP para diferenciarem linhagens do gênero *Sclerotinia*. As espécies *S. asari*, *Sclerotinia* sp. mostraram ser distintas e foram sinônimas para *S. ficariae* e *S. sclerotiorum*. Três isolados de *S. cipivorum* apresentaram fragmentos de restrição do rDNA de tamanhos idênticos. O fenótipo do fragmento de restrição rDNA das “formae speciales” foram distintas, sem um parentesco esperado entre as espécies. Para as espécies *S. sclerotiorum*, *S. minor* e *S. trifoliorum*, uma extensiva variação foi

detectada nos comprimentos dos fragmentos de restrições do mtDNA, com apenas um fragmento compartilhado por todas as espécies.

A utilização de marcadores RFLP para a análise de cruzamentos foi efetuada por STASZ *et al.* (1988). Esses autores utilizaram a técnica de RFLP com genes marcados, além de isoenzima, para analisarem as progênes obtidas por fusão de protoplastos em *Trichoderma*.

SUMMERBELL *et al.* (1989), investigaram a segregação de RFLPs em sete linhagens parentais incluindo a comercial, selvagem e heterocários artificialmente sintetizados, usando quatro sondas de plasmídeo carregando DNA nuclear de cópias simples de *Agaricus*.

XU & LESLIE (1996) construíram um mapa baseado na recombinação do fungo *Gibberella fujikuroi* (estágio assexual *Fusarium moniliforme*). O mapa foi baseado na segregação de 142 marcadores RFLP, dois genes auxotróficos (*arg1*, *nic1*), “tipos de reação sexual” (*matA*⁺/*matA*⁻), esterilidade feminina (*ste1*), “spore-killer” (*Sk*), um gene governando a produção da micotoxina fumosina B₁ (*fum1*) e dois marcadores RAPD (oligonucleotídeos OPB11 e OPB12), entre uma progênie de 121 ascósporos randômicos de um cruzamento simples. Os autores identificaram 12 grupos de ligação correspondendo a 12 cromossomos observados anteriormente em eletroforeses em gel de agarose em campo pulsado (géis CHEF). Os grupos de ligação e os cromossomos foram correlacionados via “southern blots” entre marcadores RFLP apropriados e os géis CHEF.

Ainda em relação ao gênero *Fusarium*, FERNANDEZ *et al.* (1994) fizeram uso de análises de RFLP e compatibilidade vegetativa para verificarem a variabilidade genética entre 52 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* originários de várias partes do mundo e representando as raças A, 3 e 4 em plantas de algodão. Dez VCGs diferentes foram obtidos e, isolados pertencentes a raças distintas nunca estavam em um mesmo VCG. RFLPs utilizando-se DNA ribossomal e mitocondrial como sondas, separaram 4 e 7 haplotipos respectivamente. Esses autores não acharam uma forte correlação entre raça e variabilidade genômica, mas isolados de cada raça puderam ser diferenciados pela combinação de dados de RFLPs de rDNA e mtDNA

2.4.1.2. Marcadores RAPD

Uma nova classe de marcadores genéticos, os RAPDs foi descrita por WILLIAMS *et al.* (1990). RAPD é um método de amplificação de fragmentos de DNA, que utiliza oligonucleotídeos iniciadores de seqüências nucleotídicas arbitrárias e o sistema de PCR. WELSH & McCLELLAND (1990), trabalhando concomitantemente com a mesma técnica, sugeriram o nome de AP-PCR

PCR é a abreviatura de "Polymerase Chain Reaction" e consiste em um método onde se obtém *in vitro* o aumento da quantidade de uma determinada seqüência de DNA. Para tanto, utiliza-se a enzima DNA polimerase, cofatores, desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), tampões apropriados, *primers* e o DNA molde, sendo este sistema colocado sob condições controladas. Para o monitoramento destas condições, desenvolveu-se um equipamento onde o

perfil térmico pode ser programado com relação ao tempo e dimensão. Este perfil é o chamado ciclo de amplificação (WHITE *et al.*, 1989).

Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do primer utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada “primer” com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3’ dos “primers”. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Uma maior eficiência deste método foi alcançada com o uso das enzimas Taq polimerase e Vent polimerase, isoladas de *Thermus aquaticus* e *Thermococcus litoralis* respectivamente. Estas enzimas são termoestáveis e devido a isso, torna-se desnecessário acrescentar uma nova quantidade de enzima a cada ciclo (WHITE *et al.*, 1989).

RAPD é uma variação do protocolo de PCR, diferenciando-se do mesmo por utilizar um único “primer” ao invés de um par de “primers”, oligonucleotídeos, além de que esse oligonucleotídeo, como já foi dito, tem

seqüência arbitrária, não havendo uma seqüência alvo conhecida. Segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1995), para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao oligonucleotídeo arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase.

A análise por RAPD tem sido útil para mapeamento genético e estudos de taxonomia e evolução. É uma técnica sensível a diferenças de anelamento ou tamanho dos primers (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Polimorfismos são identificados pela presença de um fragmento específico de DNA amplificado em um determinado locus, comparada à sua ausência do mesmo locus de um outro genótipo. Cada banda de DNA amplificado é o resultado da interação entre o primer e o DNA molde (WILLIAMS *et al.*, 1991).

Segundo DAVIN-REGLI *et al* (1995), o número, reproducibilidade e intensidade das bandas no RAPD são função de múltiplos parâmetros, muitos dos quais bem documentados: concentração de sais, magnésio, desoxinucleotídios trifosfatados, “primer”, Taq DNA polimerase e métodos de isolamento de DNA, número de ciclos, temperatura de anelamento e tipo de termociclador. Esses autores ainda ressaltam que apesar da aparente simplicidade desse procedimento enzimático, a influência desses parâmetros na reproducibilidade é pobremente compreendida.

A análise genética utilizando os RAPDs é rápida e não envolve hibridação ou radioatividade. Suas principais aplicações são o "fingerprint"¹ (WELSH & McCLELLAND, 1990) , o mapeamento (REITER *et al.*, 1992) e a tipagem molecular de populações e espécies (GOODWIN & ANNIS, 1991).

Em microrganismos, esta técnica tem sido largamente utilizada. SOUZA & AZEVEDO (1996), analisaram a variabilidade genética em *Bacillus* endofíticos isolados de folhas de milho em três populações, aplicando a técnica de RAPD. Os isolados provenientes de três populações de milho, tiveram sua origem relacionada com o local de ocorrência da população hospedeira. A análise de RAPD permitiu a diferenciação de quatro grupos entre os *Bacillus* endofíticos e as linhagens de referência, com aproximadamente 32% de similaridade entre si. Os autores também observaram grande variabilidade dentro do grupo, havendo relação entre dois dos grupos citados com a origem da população hospedeira.

ARAÚJO & AZEVEDO (1996) utilizaram a técnica de RAPD para verificarem a variabilidade genética em uma população de bactérias endofíticas de citros. O agrupamento realizado por meio do método UPGMA separou os isolados em dois grupos distintos.

PAFFETTI *et al* (1995) realizaram análises de RAPD em 19 linhagens de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Os dados obtidos com 5 oligonucleotídeos foram consistentes com os derivados da análise de RFLP usando-se duas sondas de DNA de *S. cerevisiae*.

¹ Identificação molecular de linhagem, determina-se um padrão molecular que a diferencie de outras

GUZMÁN *et al* (1995), utilizaram marcadores RAPD com o objetivo de caracterizarem 62 isolados do fungo *Phaeoisariopsis griseola* provenientes de 3 países diferentes (Malawi, Estados Unidos e Brasil). O pool gênico das plantas de feijão das quais os isolados foram obtidos foi determinado por análises de isoenzimas e faseolin. Onze oligonucleotídeos geraram padrões de RAPD distintos e reproduzíveis que dividiram os isolados de *P. griseola* em dois grupos principais. Isolados do grupo 1 foram geralmente obtidos dos materiais do pool gênico Andino, enquanto os isolados do grupo 2 foram obtidos de materiais mesoamericanos.

DOUDRICK *et al* (1995), identificaram ligações genéticas entre os dois fatores de “tipos de acasalamento” e 115 marcadores RAPD em uma população de 96 homocários de um basidiome simples do fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor*. Os marcadores RAPD cobriram aproximadamente 57% do genoma do fungo.

KHUSH *et al* (1992), analisaram por RAPD linhagens selvagens e comerciais do cogumelo *Agaricus bisporus*. Os marcadores RAPD identificaram sete genótipos distintos entre oito linhagens heterocarióticas, sendo que duas das linhagens comerciais mostraram estar relacionadas com as selvagens. Esses autores também utilizaram os marcadores RAPD para verificarem a formação de um heterocário híbrido e para analisarem a progênie meiótica dessa nova linhagem.

ZHANG & MOLINA (1995), também trabalhando com cogumelos, utilizaram marcadores RAPD para analisarem a variabilidade em 15 linhagens de *Lentinula edodes*. Treze das quinze linhagens estudadas tiveram

“fingerprints” únicos, enquanto *L. edodes* ATCC 28759 e ATCC 28760 exibiram perfis de RAPD idênticos para todos os oligonucleotídeos utilizados.

COOKE *et al* (1996) examinaram ao nível molecular, usando 20 oligonucleotídeos randômicos decâmeros em RAPDs e pelo sequenciamento das regiões espaçadoras dos transcritos ITS1 e ITS2 do RNA ribossomal, o relacionamento das espécies *Phytophthora iranica*, *P. clandestina*, *P. pseudotsugae*, *P. cactorum* e nova espécie *P. idaei* com a especificidade obtida em testes de patogenicidade à framboesa.

YUAN *et al* (1995), baseados na técnica de RAPD, desenvolveram um novo método para se separar as espécies *Aspergillus parasiticus* e *A. sojae* que são bastante similares morfológicamente. Três decâmeros, OPA-04, OPB-10 e OPR-01, discriminaram adequadamente as linhagens nas análises de RAPD. Os autores também conseguiram identificar como *A. flavus* e *A. sojae*, duas linhagens erroneamente identificadas e classificadas, CCRC 32423 e CCRC 30227, respectivamente, sugerindo que a técnica de RAPD é uma ferramenta rápida e eficaz para se distinguir *A. parasiticus* de *A. sojae*.

A utilização da técnica de RAPD com o objetivo de se diferenciar e identificar espécies de fungos também foi empregada por LIU *et al* (1995). Esses autores testaram 30 diferentes decâmeros randômicos e encontraram um oligonucleotídeo (5'-CCGAGGTGAC-3') que amplificou vários fragmentos no DNA dos fungos endofíticos *Acremonium lolii* e *Acremonium coenophialumi*, claramente diferentes dos produzidos em outros gêneros de fungos. A amplificação de outras bandas em torno de 0.7, 0.9 e 2.1 Kb utilizando-se o

primer acima, pôde ser empregada para a identificação de ambas culturas de *A. lolii* e *A. coenophialum*, bem como a presença de uma banda adicional em torno de 0.5 Kb pôde ser usada para diferenciar *A. lolii* de *A. coenophialum*.

FERNÁNDEZ & HANLIN (1996), analisaram variedades do fungo *Diaporthe phaseolorum* utilizando caracteres morfológicos quantitativos e análises de RAPD. O agrupamento dos isolados de *D. phaseolorum*, baseados na similaridade do padrão de bandas, correspondeu aos agrupamentos baseados nos caracteres morfológicos.

Além desses trabalhos supracitados, estudos envolvendo marcadores RAPD tem sido realizados em diversos outros fungos: *Histoplasma capsulatum* (KERSULYTE *et al.*, 1992), *Candida parapsilopsis* (LOTT *et al.*, 1993), *Tuber magnatum* (LANFRANCO *et al.*, 1993), *Metarhizium* e *Beauveria* (BIDOCHKA *et al.*, 1994; FUNGARO *et al.*, 1996) e *Diaporthe phaseolorum* (FERNÁNDEZ & HANLIN, 1996), reforçando a grande aplicabilidade da técnica de RAPD.

2.4.1.2.1. RAPD em *Fusarium* sp.

Diversos trabalhos tem sido realizados com RAPD no gênero *Fusarium* envolvendo análise de variabilidade, mapeamento genético, diferenciação de isolados e associação isolado/hospedeiro dentre outros. CROWHURST *et al.* (1991), utilizaram a técnica de RAPD para analisarem a variabilidade genômica entre 21 isolados de *F. solani* f.sp. *cucurbitae* das raças 1 e 2. Baseados nos padrões de marcadores RAPD, os isolados foram alocados em dois grupos distintos correspondendo às populações MPI e MPV. Quatro

isolados que não puderam ser atribuídos a um ou outro tipo de população pelos meios tradicionais, foram distinguidos pelos padrões de RAPD.

O emprego da técnica de RAPD para o estudo de populações do gênero *Fusarium* também foi realizado por HERING & NIREMBERG (1995). Eles obtiveram padrões informativos típicos para populações de *F. sambucin*, *F. torulosum* e *F. venenatum* utilizando 10 oligonucleotídeos arbitrários e seqüências repetitivas simples (M13, (GACA)₄) como oligonucleotídeos simples.

BENTLEY *et al* (1994), analisaram a variação genética entre 11 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) por RAPD. Os isolados representavam três das quatro raças de FOC e os sete grupos de compatibilidade vegetativa conhecidos por ocorrer na Austrália. Isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* também foram comparados à isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* f. sp. *Gladioli*, *F. oxysporum* f. sp. *Zingiberi*, *Aspergillus niger* e *Colletotrichum gloeosporioides*. A análise de RAPD revelou uma variação em todos os cinco níveis possíveis de relacionamentos genéticos examinados. *F. oxysporum* f. sp. *cubense* pôde ser facilmente distinguido dos outros fungos, além do que as três raças e cinco VCGs de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* também puderam ser diferenciados.

BENTLEY *et al* (1995), retornaram a utilizar a técnica de RAPD em estudos com *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Esses autores analisaram a variação genética em uma coleção mundial de isolados do fungo em questão com representantes das raças 1, 2 e 4 e 11 diferentes grupos de compatibilidade vegetativa. A comparação de ambos padrões de bandas do RAPD, visual e análise fenética, subdividiu os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* em dois grupos.

O padrão de bandas do RAPD foi geralmente específico aos VCGs, tendo sido possível determinar a relação genética entre os diferentes VCGs e os isolados dentro de cada VCG, não havendo contudo correlação entre o padrão de RAPD e raça. Os resultados deram suporte à hipótese de que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* co-evoluiu com as bananas e seus progenitores diplóides selvagens no sudeste da Ásia.

MANULIS *et al* (1994), utilizaram a técnica de RAPD para separarem isolados patogênicos de não patogênicos de *Fusarium oxysporum* recuperados de cravo. Cinquenta e oito isolados, incluindo 42 isolados patogênicos da raça 2, um isolado patogênico da raça 4 e 15 isolados não patogênicos, foram examinados por RAPD com 30 oligonucleotídeos decâmeros arbitrários. Os padrões de RAPD produzidos por 22 oligonucleotídeos permitiram a clara distinção entre isolados patogênicos e não patogênicos.

KELLY *et al.* (1994a) também utilizaram marcadores RAPD para caracterizarem patotipos de *F. oxysporum*. Neste caso, eles trabalharam com a “forma specialis” que infecta ervilha. Os autores analisaram o DNA de 63 isolados de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* e de 11 isolados de outras espécies de *Fusarium*. A análise dos RAPDs pelo método UPGMA baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando-se o programa NTSYS, permitiu a separação dos isolados de *F. o. ciceris* em dois grupos distintos correlacionados com os patotipos que causam um tipo específico de doença em ervilhas. Esses grupos foram claramente diferentes de um outro grupo constituído por outras “forma speciales” de *F. oxysporum* e por um quarto grupo formado por patógenos de ervilha como *F. eumartii*, *F. solani* e *Ascochyta rabiei*. Esses autores ainda utilizaram análises de

RAPD para classificarem 21 isolados que ainda não haviam sido caracterizados, como patótipos que causam doença em ervilha.

WRIGHT *et al.* (1996), selecionaram para patogenicidade e agruparam de acordo com a compatibilidade vegetativa e padrões de RAPD, isolados de *F. oxysporum* coletados de cravos sem sintomas de diversas propriedades produtoras de cravo da Austrália. A coleção de 82 isolados australianos foram separados em 23 grupos diferentes de compatibilidade vegetativa. Dos 69 isolados testados para patogenicidade, 24 foram patogênicos aos cravos enquanto os 45 remanescentes foram não patogênicos. A análise de RAPD revelou dois padrões distintos de bandas que puderam distinguir os isolados patogênicos dos não patogênicos, além de diferenciar os isolados dos dois VCGs patogênicos.

YLI-MATTILA *et al.* (1996), analisaram 33 isolados de *Fusarium avenaceum* baseados em análises de RAPD e isoenzimas. Entre oito enzimas analisadas, um claro polimorfismo isoenzimático foi detectado em cinco enzimas. Esses polimorfismos puderam ser agrupados em 20 diferentes fenótipos eletroforéticos e em três grupos principais com um nível de similaridade de 70%. As análises de RAPD diferenciaram todas as linhagens de *F. avenaceum*. Os fenótipos resultantes das análises de RAPD, agruparam os isolados em cinco grupos principais ao nível de 55% de similaridade. Esses grupos tiveram diversas similaridades com os principais grupos das análises isoenzimáticas. O RAPD também foi utilizado para separar linhagens de diferentes espécies de *Fusarium*.

Alguns poucos trabalhos têm sido desenvolvidos envolvendo marcadores RAPD e a espécie *F. moniliforme*. AMOAH *et al.* (1995)

determinaram as características genéticas dos isolados de *F. moniliforme* isolados de milho, arroz e sorgo e coletados de diferentes regiões de Ghana, usando as técnicas de RAPD e RFLP. Os “fingerprints” dos DNAs detectados pelos RFLPs e RAPDs separou os isolados em grupos definidos.

AMOAHA *et al.* (1996), utilizaram a técnica de RAPD para determinarem os “grupos de acasalamento” de diversos membros de *Fusarium* seção *Liseola* também recuperados de milho, arroz e sorgo e coletados de diferentes locais em Ghana. Três “grupos de acasalamento” foram identificados: A, D e F, dos quais os isolados de A e F foram confirmados por estudos de acasalamentos. Os isolados recuperados de milho foram predominantemente do grupo A, enquanto a maioria dos isolados de sorgo pertenceram ao grupo F. Os autores ressaltam que, embora exista a tendência dos isolados obtidos de um hospedeiro específico pertencerem ao mesmo “grupo de acasalamento”, isso não tem um significado absoluto, já que na literatura isolados pertencentes ao grupo E foram reportados como de milho, enquanto do grupo B foram reportados de pinho e cana-de-açúcar.

O estudo genético de fungos, como anteriormente ressaltado, utiliza-se de ferramentas, tais como a obtenção e análise de mutantes auxotróficos ou morfológicos, e o estudo da variabilidade genética pela utilização de marcadores moleculares. Além desses, o estudo da recombinação genética de linhagens pela via clássica (ciclo sexual ou parassexual) ou por vias alternativas, como a fusão de protoplastos e a transformação genética pelo emprego da Tecnologia do DNA Recombinante, possuem uma importância capital na melhor compreensão da organização do genoma dos fungos. Esta última vem abrindo uma infinidade de possibilidades no emprego de fungos como sistemas naturais de

transformação genética de plantas (item 2.1.3.2), estudo de eventos de transposição genética, melhoramento genético com a obtenção de linhagens com características de interesse (agronômico, médico-farmacêutico, industrial, etc), ou simplesmente variantes genéticos.

2.5. Transformação genética

De acordo com AZEVEDO (1995), uma das grandes dificuldades encontradas no início da Genética de Fungos foi a falta de um sistema de recombinação que, à semelhança da transformação bacteriana, pudesse promover a incorporação de DNA dentro das células de fungos. Possuindo paredes extremamente espessas, os fungos eram refratários ao sistema de transformação e, conseqüentemente, isto impedia que os mesmos pudessem ser usados.

Segundo AZEVEDO (1995), o primeiro trabalho de transformação genética de fungos filamentosos ocorreu com a demonstração de que o DNA isolado de linhagens selvagens de *Neurospora crassa* era capaz de efetivar transformação, embora em baixas frequências, em células de uma linhagem deficiente para o uso do inositol. Ainda segundo esse autor, esta transformação com o DNA total mostrou também que os transformantes eram instáveis, de modo que pouca atenção foi dada ao processo como sendo viável na prática. Essa situação começou a se modificar quando em 1978 se demonstrou que a transformação podia ocorrer em *S. cerevisiae* e, logo depois, em 1979, a eficiência do processo foi aumentada em *N. crassa*, nestes casos usando-se não mais o DNA total, mas um plasmídeo de *Escherichia coli* carregando genes de

fungos. Hoje o processo de transformação está bem estabelecido em fungos, tanto leveduras como filamentosos.

Atualmente vários sistemas tem sido empregados na transformação genética de fungos, isto é, o tipo de marcadores empregados (auxotróficos, resistência a antibióticos, morfológicos) e seqüências de DNA de interesse (genes estruturais ou regulatórios), que podem ser homólogos, se a seqüência empregada na transformação tiver sido isolada da mesma espécie da linhagem receptora, ou heterólogos, se a seqüência tiver sido isolada de uma espécie diferente da linhagem receptora.

A transformação genética pode ser realizada utilizando-se diversos tipos de vetores: plasmídios, cosmídios ou fagos. Em sua grande maioria, os experimentos de transformação genética em fungos são realizados utilizando-se seqüências de DNA inseridas em plasmídios. Essas seqüências de DNA, genes exógenos quando transferidos para um novo genoma possuem dois caminhos principais. Eles podem vir a se integrar ao DNA cromossomal original do transformante ou não. Nesse último caso resultam os chamados transformantes abortivos, onde o gene exógeno, por não estar integrado, acaba perdendo-se no processo das divisões celulares.

Quando os genes exógenos são integrados ao cromossomo do fungo hospedeiro, essa integração, conforme AZEVEDO (1995), deve ocorrer em uma das três formas: a) uma integração em sítio homólogo por uma permuta entre o plasmídio carregado e o gene no cromossomo do fungo, ficando então no cromossomo do fungo tanto o gene original mutante, como o plasmídio carregando o gene selvagem; b) uma integração ao acaso, onde o plasmídio é

incorporado a um local não homólogo do cromossomo.; c) substituição de genes (gene mutante do hospedeiro pelo exógeno) por uma permuta dupla ou mesmo por conversão gênica (figura 2.2).

Figura 2.2 Os três casos possíveis de integração de genes carregados por plasmídeos introduzidos por transformação em fungos filamentosos (AZEVEDO, 1995).

2.5.1. Transformação genética : sistema da nitrato redutase (NIA)

Diversos pesquisadores tem utilizado o sistema da nitrato redutase, ou seja, a transformação de fungos com o gene *nia*, com diversos objetivos: clonagem gênica; desenvolvimento da metodologia de transformação em fungos com estudos genéticos incipientes ou como marcador selecionável em experimentos de cotransformação.

DABOUSSI *et al* (1989), efetuaram a transformação genética de sete espécies de fungos filamentosos usando o gene da nitrato redutase de *A. nidulans*. Como todos os mutantes *nia* das diversas espécies analisadas (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Nectria haematococca*, *Pyricularia oryzae*, *Aphanocladium album*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium caseicolum*) puderam ser transformadas com uma cópia funcional do gene de *A. nidulans*, mostrou uma expressão permissiva desse gene em fungos taxonomicamente diversos. Ainda segundo esses autores, o sistema de transformação *nia* é simples e rápido, podendo vir a ser útil em espécies de fungos em que o sistema de transformação genética não está ainda estabelecido. Além disso, ele poderia ser usado como um segundo marcador selecionável para se testar a eficiência de cotransformação em organismos ainda a serem transformados.

MALARDIER *et al* (1989), desenvolveram um sistema de transformação heteróloga para o fungo fitopatogênico *F. oxysporum* baseado no uso do gene da nitrato redutase de *A. idulans* (*niaD*). Mutantes *nia*⁻ de *F. oxysporum* foram facilmente selecionados pela resistência ao clorato. O gene

niaD de *A. nidulans* foi isolado de um banco genômico por complementação de um mutante *niaD* de *A. nidulans*. O gene clonado foi capaz de transformar mutantes *nia*⁻ de *F. oxysporum*. Análises de hibridação do DNA dos transformantes de *F. oxysporum* mostrou que a transformação resultou na integração de uma ou mais cópias do vetor DNA no genoma.

LANGIN et al (1990), com o objetivo de aumentar a eficiência de transformação no *F. oxysporum*, determinaram a influência de alguns parâmetros biológicos na eficiência de transformação e testaram a eletroporação como um novo método para transferência de DNA. Eles determinaram condições que os levaram a obter uma eficiência de algumas centenas de transformantes por µg de DNA, que representa um acréscimo na frequência de transformação até o fator 100. Eles obtiveram eficiências de transformação similares tanto por eletroporação quanto pelo método químico. Uma análise molecular dos transformantes revelou que uma cópia simples de DNA foi preferencialmente integrada pela eletroporação.

DIOLEZ et al (1993), isolaram e sequenciaram o gene nia de *Fusarium oxysporum*, bem como desenvolveram um sistema de transformação homóloga onde obtiveram uma frequência de transformação de até 600 transformantes por µg de DNA. Os autores fizeram um banco genômico de *F. oxysporum* e, transformando mutantes *nia*⁻, identificaram um cosmídio do banco que continha DNA de *Fusarium* que complementava a mutação (cos23), concluindo que esse plasmídio (pcos23) continha o gene funcional da nitrato redutase de *F. oxysporum*. Testando diversos fragmentos obtidos por diferentes enzimas de restrição em experimentos de transformação, os autores verificaram que o gene *nia* completo estava presente no fragmento EcoRI ou PstI. O

fragmento de 7,2 Kb obtido pela EcoRI, subclonado em pUC19, originando o plasmídio pNE24, confirmou a presença do gene funcional *nia*. Esse gene foi mais precisamente localizado em um fragmento de 4 Kb obtido por HindIII, tendo sido subclonado em pUC19 constituindo o plasmídio pNH24.

CAMPBELL, *et al* (1989), relataram o primeiro trabalho no sistema *niaD* incluindo frequências significativamente altas de transformação homóloga, taxas de co-transformação e marcadores não selecionáveis, bem como o padrão de integração e a habilidade do gene *niaD* de *Aspergillus niger* de transformar outros fungos filamentosos. Eles obtiveram uma frequência 4%, 10% e 16% para cotransformações com β -galactosidase, β -glucuronidase e β -tubulina, respectivamente, em *Aspergillus niger*.

FURLANETO & PEBERDY (1993), realizaram uma transformação heteróloga do *Aspergillus alliaceus* baseado no gene estrutural da nitrato redutase de *A. niger* (*niaD*). Eles isolaram dois mutantes *nia⁻* por meio de uma seleção de células irradiadas com luz ultravioleta.

2.5.2. Transformação genética: sistema higromicina e outros marcadores de resistência

Consoante KELLY *et al* (1994b), diversos fungos filamentosos tem sido transformados geneticamente usando-se marcadores dominantes de resistência a drogas ou por complementação de mutações auxotróficas. Segundo esses autores, a vantagem da estratégia de seleção com marcadores dominantes é que uma linhagem especificamente marcada não é necessária como hospedeira no processo de transformação. Resistência à higromicina B tem sido usada como um

marcador dominante de transformação em diversos fungos incluindo *Magnaporthe grisea*, *Gibberella pulicaris*, *Fusarium solani*, *Hebeloma cylindrosporum* e *Fusarium oxysporum*.

KISTLER & BENNY (1988), realizaram a transformação genética do *F. oxysporum* com o gene da fosfotransferase da higromicina B bacteriana ligado à seqüências regulatórias de *Aspergillus*, que conferem resistência à higromicina B em *Fusarium*.

LESLIE & DICKMAN (1991), usaram linhagens de *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) transformadas com o gene *hyg^r* de *E. coli* visando o estudo da estabilidade meiótica do DNA exógeno nesse fungo. Esses autores verificaram que cruzamentos com transformantes de cópia única segregaram *hyg^r:hyg^s* em 1:1, sendo consistente com o que seria esperado para um locus mendeliano em um organismo haplóide. Transformantes com cópias múltiplas no entanto, segregaram *hyg^r:hyg^s* em 1:2, não estando de acordo com o padrão de herança mendeliano para marcadores cromossomais, mesmo quando 2 genes nucleares auxotróficos não relatados tenham segregado normalmente.

SALCH & BEREMAND (1993) transformaram o fungo *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) com três diferentes vetores: cos Hug1, pUCH1 e pDH25. Os três vetores possuem o gene *hph* (que codifica a fosfotransferase higromicina B) como marcador selecionável.

CROWHURST *et al* (1992), desenvolveram um sistema altamente eficiente de transformação genética para o fungo *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* raça 2 baseado no gene da resistência à higromicina. Eles conseguiram

freqüências de transformação de até cerca de 10^7 transformantes/ μg DNA. Fatores importantes na obtenção dessa eficiência marcante incluíam: a manutenção de um estabilizador osmótico em todas as etapas, a concentração do PEG 4000 (de 40% para 60%) e a relação entre a quantidade de vetor DNA e protoplastos. Contudo, uma considerável variação nas freqüências de transformação foi obtida quando diferentes preparações de protoplastos foram utilizadas, indicando que outros fatores biológicos não definidos também são significativos na obtenção de altas freqüências de transformação.

LEUNG *et al* (1990), realizaram a primeira transformação de *Magnaporthe grisea* usando-se um marcador selecionável. Ambos plasmídios pAN7-1 e cosmídio pAN7-2 foram capazes de transformar esse fungo para resistência à higromicina B. A freqüência de transformação de 1-10 transformantes/ μg de DNA foi calculada pelo número de colônias resistentes à droga que cresceram na segunda camada de meio.

Para se determinar o modo de integração do vetor no genoma do fungo, o DNA de transformantes selecionados randômicamente foi analisado em experimentos de hibridização usando-se o pAN7-2 como sonda. Diversos tipos de integração, incluindo integração em tandem em sítios únicos ou múltiplos, e integração de uma cópia do vetor em sítio único, foram observadas.

KELLY *et al* (1994b), apresentaram o primeiro trabalho de transformação genética do gênero *Zalerion*. Eles desenvolveram dois sistemas de transformação para o fungo *Z. arboricola*: com o gene que confere resistência à higromicina B e com o gene da nitrato redutase (*niaD*). Eles obtiveram uma freqüência inicial de transformação de cerca de 4 transformantes/ μg DNA quando

usaram o plasmídio pCSN43 que contém o gene *hph* de *E. coli* sob o controle dos sinais de transcrição do *trpC* de *A. nidulans*. Eles aumentaram essa frequência de 4 a 6 vezes utilizando o vetor linearizado na transformação. Ao adicionarem uma sequência autônomo-replicativa (AMA1) de *A. nidulans* ao pCSN43, os autores obtiveram um ganho na frequência de 3 vezes e produziram, em contrapartida, numerosos transformantes abortivos. Os autores também obtiveram transformantes para o gene *niaD*.

KELLY *et al* (1994b), combinaram os dois sistemas em duas diferentes cotransformações: eles utilizaram ou o plasmídio que continha o gene da nitrato redutase de *A. nidulans* ou gene de *C. acremonium* em conjunto com o plasmídio que carregava o gene *hph*. A primeira seleção foi feita para a resistência à higromicina, enquanto a segunda para a utilização do nitrato. Cerca de 33% dos cotransformantes com o gene *niaD* de *C. acremonium* foram capazes de utilizar o nitrato, enquanto nenhum cotransformante com o gene *niaD* de *A. nidulans* foi capaz de fazê-lo.

Além do marcador resistência à higromicina, outros marcadores de resistência tem sido utilizados. MAREK *et al* (1989) efetuaram uma transformação molecular do *F. solani* com um marcador de resistência à antibiótico sem homologia ao DNA do fungo. Os autores construíram um vetor formado pelo promotor 35Sp do vírus do mosaico da couve-flor fusionado ao gene bacteriano APH(3')II, que confere resistência ao antibiótico aminoglicosídeo G418.

Eles desenvolveram dois procedimentos de transformação: um envolvendo protoplastos e outro usando esporos germinados. Comparativamente,

os protoplastos apresentaram uma maior eficiência de transformação, enquanto os esporos germinados exibiram uma maior viabilidade.

BERNIER *et al* (1989), transformaram o *M. anisopliae* para a resistência ao fungicida benomil usando o cosmídio pSV50 com o gene da β -tubulina clonado de um mutante resistente ao benomil de *Neurospora crassa*. Os transformantes retiveram a capacidade de infectar e matar larvas de *Manduca sexta*. Dois transformantes foram menos virulentos do que o tipo selvagem e um deles mostrou uma menor germinação dos esporos *in vitro*. A resistência ao benomil persistiu nos isolados dos insetos mortos.

LONGO *et al* (1995) desenvolveram um sistema de transformação genética para isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*, com o gene heterólogo de resistência ao benomil. Os autores obtiveram uma eficiência de transformação em torno de 6 transformantes/ μ g DNA.

2.5.3. Transformação genética: sistema GUS

Segundo JEFFERSON (1988), o gene de *E. coli* que codifica a beta-glucuronidase (GUS) tem sido desenvolvido para o uso como um gene repórter em plantas transgênicas e tem muitas propriedades que o torna ideal para experimentos de fusão gênica. Esse gene também, por suas propriedades, tem sido utilizado em microrganismos, principalmente quando se objetiva estudar a relação microrganismo-planta *in loco*. De acordo com JEFFERSON (1988), a enzima

GUS é muito estável e pode ser analisada usando-se numerosas análises espectrofotométricas, fluorométricas e histoquímicas. A enzima GUS não tem cofatores ou quaisquer requerimentos iônicos, embora, pelo fato dela ser inibida por alguns íons de metal divalentes (Cu^{+2} e Zn^{+2}), seja prudente incluir EDTA quando da análise. A glucuronidase pode ser analisada em qualquer pH fisiológico, com seu ótimo entre 5.2 e 8.0. A enzima é em torno de 50% ativa no pH 4.3.

Ainda segundo JEFFERSON (1988), existem vários métodos para a análise da enzima GUS. Nos métodos de fluorescência, a detecção da atividade da beta-glucuronidase depende da disponibilidade dos substratos para a enzima que, quando atua no substrato, libera um produto que é distinguível do substrato. Um substrato que é designado para maximizar a sensibilidade da detecção da enzima deve ter várias propriedades. Deve haver um método que detecte o produto muito especificamente. O substrato deve ser quebrado somente pela enzima sob estudo, com clivagem espontânea mínima. O sinal produzido usando-se o método de detecção deve ser o maior possível. O autor destaca que essas propriedades são melhor obtidas pelo uso de substratos para a beta-glucuronidase, como o 4-metil umbelliferil glucuronide (MUG). Esse componente não é fluorescente até ser clivado pela beta-glucuronidase para liberar o 4-metil umbeliferone. O produto é fluorescente somente quando o grupo hidroxil é ionizado. O pKa desse hidroxil é em torno de 8, e a fluorescência máxima somente pode ser obtida se o produto está em solução em um pH maior do que o pKa; a fluorescência é relativamente baixa no pH neutro das células.

O uso de medições por fluorescência para detectar a atividade da enzima normalmente permite uma sensibilidade duas a quatro ordens de

magnitude maior do que métodos que empregam determinação espectrofotométrica da concentração dos produtos por absorção, métodos colorimétricos. Técnicas que detectam a absorção, medem uma pequena diferença entre dois valores grandes, enquanto técnicas de fluorescência medem um valor absoluto sobre um pequeno e arbitrário “background”.

Conforme JEFFERSON (1988), uma análise qualitativa muito conveniente e sensível pode ser feita pondo tubos eppendorf ou placas (do tipo das placas Elisa) contendo o material em tampão de extração apropriado com o substrato em luz ultravioleta de longo comprimento de onda de 365 nm e observando a fluorescência.

Afora os métodos de análise de fluorescência ou colorimétricos, espectrofotométricos, também existem as análises histoquímicas envolvendo a enzima GUS. Consoante JEFFERSON (1988), o melhor substrato correntemente disponível para a localização histoquímica da atividade da beta-glucuronidase nos tecidos e células é o 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronide (X-GLUC). Esse substrato trabalha muito bem, dando um precipitado azul no sítio da atividade da enzima.

Fungos tem sido marcados via transformação genética com o gene da enzima GUS com o objetivo de se realizar estudos ecológicos, monitoramento e dinâmica populacional no ambiente, mais propriamente, nas plantas.

COUTEAUDIER *et al* (1993) objetivando o monitoramento e quantificação de sua biomassa nas plantas, transformaram o fungo fitopatogênico

F. oxysporum com o gene da β -D-glucuronidase de *E. coli* (gusA) (sistema GUS) em combinação com o gene para nitrato redutase (niaD) como marcador de seleção. Elevados níveis de atividade GUS ocorreram em alguns transformantes, mas a atividade em *F. oxysporum* não pareceu estar correlacionada com o número de cópias do gene gusA. Desde que uma alta atividade foi encontrada em um transformante com uma cópia simples, pôde-se considerar que seqüências de *F. oxysporum* integradas região acima do gene podem agir como um promotor ou "enhancer". A expressão do gene gusA também foi determinado durante o crescimento do fungo na planta, indicando que o sistema GUS pode ser usado como um sensível e fácil sistema de gene repórter em *F. oxysporum*.

GREEN & JENSEN (1995) visando o desenvolvimento de metodologias que facilitem estudos ecológicos de um biocontrole de fungos no solo e em misturas sem solo, utilizaram o gene da enzima GUS como um marcador para monitorarem a presença, o desenvolvimento populacional e a atividade de uma linhagem de *Trichoderma harzianum* na rizosfera de pepino. Quando compararam o transformante com o isolado selvagem, não ocorreu uma diferença significativa em termos de desenvolvimento populacional. Em um tratamento combinando o selvagem e o transformante, a proporção de colônias com atividade GUS nas placas foi constante durante todo o experimento. A enzima GUS foi extraída da rizosfera infestada e analisada espectrofotometricamente. A curva de atividade foi inversamente proporcional à curva populacional. A quantificação de conídios ativados pelo corante diacetato de fluoresceína, indicou que a atividade GUS correlacionava com a atividade do fungo. As hifas de *T. harzianum* coradas com 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronide (X-gluc) foram facilmente detectadas nas raízes.

THRANE *et al.* (1955) também visando o estudo da dinâmica populacional de *T. harzianum*, cotransformaram o fungo com o gene *uidA* da beta-glucuronidase de *E. coli* e com o gene da higromicina B (*hygB*) como marcador de seleção. Outros autores também trabalhando com GUS procuraram estudar a colonização de raízes por fungos (LILJEROTH *et al.*, 1993) ou detectar e quantificar patógenos em plantas infectadas (OLIVER *et al.*, 1993).

2.6. Transposons

Provavelmente, a descoberta mais surpreendente no campo da genética molecular é a existência de numerosas seqüências de DNA que podem ser duplicadas e inseridas em muitos sítios do genoma. Esses elementos móveis incluem os epissomos, os quais podem se autoduplicar, mesmo quando não inseridos em cromossomos, e outras seqüências denominadas ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS ou TRANSPOSONS, que se duplicam somente quando inseridos. (FUTUYMA, 1993).

Segundo OLIVER (1992), alguns critérios devem ser levados em consideração ao se determinar a presença de transposons. A melhor evidência seria a de uma seqüência de DNA que tenha aparecido em um gene que tenha previamente perdido a inserção. O efeito fenotípico normal seria a inativação do gene e por isso seria aplicado usualmente a genes cuja atividade possa ser selecionada contra. Isso incluiria os genes para a redução do nitrato, a síntese de uridina e glutamato desidrogenase. O principal requerimento seria, normalmente, que o gene esteja clonado e que “Southern blots” dos mutantes sem a atividade possam ser ensaiados para inserções com a sonda clonada.

Ainda segundo OLIVER (1992), o segundo critério seria que seqüências clonadas devem possuir similaridades estruturais às seqüências de transposons caracterizadas. Alguns fatores importantes a serem conhecidos seriam os requerimentos estruturais para a transposição de retrotransposons, por exemplo. A demonstração dessas características estruturais seria uma boa evidência para a presença de transposons no genoma, se não por sua atividade.

Terceiro, tem-se demonstrado que um número de genomas de fungos contêm seqüências homólogas a vários transposons caracterizados por comparação direta de seqüências ou mais fracamente, por hibridização heteróloga. A maioria dessas seqüências devem possuir similaridades estruturais e de seqüências a transposons conhecidos. Nesse contexto, é possível distinguir elementos autônomos que podem transpor usando seus próprios produtos gênicos de elementos defectivos que requerem ativação em *cis*. (OLIVER, 1992).

O quarto critério utilizado para demonstrar a presença de transposons é a observação de polimorfismos de tamanho por restrição entre isolados ou raças de uma seqüência repetitiva. Esses polimorfismos podem resultar de um número de eventos moleculares outros do que a transposição. (OLIVER, 1992).

Finalmente, transposons podem ser revelados pelos aparatos moleculares requeridos para sua transposição antes do que pela sua presença no genoma. Esses aparatos como a atividade da transcriptase reversa e partículas semelhantes a vírus podem ser visualizadas como uma evidência circunstancial de sua presença. (OLIVER, 1992).

Segundo McCLINTOCK (1951), as evidências genéticas da presença de elementos transponíveis no genoma são fornecidas pelas mutações instáveis. A excisão imprecisa dos elementos de transposição e os rearranjos cromossômicos causados por eles produzem derivativos que possuem fenótipos variados, desde o selvagem (reversão) até o pseudo-selvagem ou novos mutantes. O tempo em que um derivativo de uma mutação instável surge está relacionado ao ciclo de vida do organismo, dependendo do estágio de desenvolvimento do mesmo. Em relação a essa questão, AZEVEDO & ROPER (1970) e AZEVEDO (1975) sugeriram a atuação de elementos transponíveis em linhagens duplicadas de *A. nidulans* como responsáveis pela alta instabilidade mitótica apresentada.

Conforme McDONALD (1993), os elementos transponíveis estão classificados em dois grupos principais baseados em seus modos de transposição: Classe I, ou retroelementos, é constituída por elementos transponíveis que transpõem pela transcrição reversa de um RNA intermediário. Classe II, elementos DNA, consiste de elementos que transpõem diretamente de DNA para DNA. A classe I é adicionalmente dividida em duas subclasses. Classe I.1, de retrotransposons, possuem longas repetições terminais (LTRs) e codificam produtos com homologia estrutural às proteínas codificadas pelos genes retrovirais *gag* e *pol*. Classe I.2, os transposons não-LTR [similares aos elementos LINE (longos elementos intercalantes: “long interspersed element”), retrotransposons poli(A)], também codificam proteínas semelhantes às do *gag* e *pol* mas não possuem LTRs e carregam uma cauda de poli (A) nas suas extremidades 3'. Elementos curtos intercalantes (SINES) ou seqüências semelhantes à *Alu* transpõem via um RNA intermediário mas não são formalmente considerados elementos da Classe I porque, diferentemente dos retroelementos,

eles não codificam a transcriptase reversa (RT) necessária para sua retrotransposição. SINEs são então o produto dos retroelementos e não retroelementos eles mesmos.

Elementos da Classe II são caracterizados por suas pequenas repetições terminais invertidas de menos do que 100 pb flanqueando uma sequência interna codificadora de transposase que funciona em um único mecanismo de transposição DNA. Alguns elementos DNA podem ser organizados em subgrupos baseados em similaridades relativas de suas transposases. Contudo, uma relação evolucionária não tem sido ainda estabelecida entre diversos grupos de elementos DNA. (McDONALD, 1993).

Em fungos, diversos transposons tem sido relatados. Um elemento genético móvel isolado em fungos filamentosos que tem sido bastante estudado é o retrotransposon *Tad* de *Neurospora crassa*. Esse transposon foi determinado por (KINSEY & HELBER, 1989) que trabalhando com uma linhagem selvagem instável chamada *Adiopodoume*, selecionando mutantes espontâneos no gene *am* (que codifica a glutamato desidrogenase), seguido de cruzamentos com uma linhagem de laboratório, descobriram uma sequência de 7 Kb. A caracterização dessa sequência mostrou que a sua estrutura é bastante similar ao grupo de transposons LINE, os quais são característicos de genomas de mamíferos. CAMBARERI, *et al* (1994), clonaram e sequenciaram um elemento *Tad* ativo, *Tad-1*. A comprovação da atividade do elemento foi feita por meio da observação da sua habilidade de transpor entre núcleos. Comparativamente com um outro elemento ativo *Tad3-2*, observou-se que tinham cerca de 7 Kb e possuíam dois quadros de leitura abertos (ORFs) codificados na fita de mesma polaridade no transcrito total.

SCHMID-BERGER *et al* (1994) determinaram um elemento altamente repetitivo no genoma do fungo dimórfico *Yarrowia lipolytica*, o elemento *Ylt* 1. Esse elemento assemelha-se a retrotransposons encontrados em outros eucariotos. Ele tem cerca de 9,4 Kb e pode transpor no genoma. O elemento *Ylt*1 é flanqueado por uma longa repetição terminal (LTR), o elemento zeta. Os autores isolaram e sequenciaram diversas cópias do elemento zeta. A sequência desse elemento é bem conservada e possui cerca de 714 pb, sendo flanqueada pelos nucleotídeos 5' - TG...CA-3', que são parte de uma pequena repetição invertida, uma característica conservada nos LTRs dos retrovírus e retrotransposons.

GLAYZER *et al* (1995), isolaram um elemento transponível do fungo *Aspergillus niger* (linhagem N402). O elemento foi identificado como uma sequência inserida na região codificadora do gene da nitrato redutase. Ele estava inserido no sítio TA e duplicou o sítio alvo na inserção. O elemento isolado tinha cerca de 4.798 pb de comprimento e continha 37 pb de imperfeitas repetições terminais invertidas (ITRS). A sequência central do elemento revelou um quadro de leitura aberto denominado ORF1, que mostrou similaridade, ao nível de aminoácido, à transposase da classe de transposons DNA *TC1/mariner*. Uma outra sequência dentro da região central do elemento mostrou similaridade com a região codificadora 3' e região abaixo não traduzida do gene *amyA* de *A. niger*. O elemento *Ant*1 está aparentemente presente como uma cópia única na linhagem N402 de *A. niger*.

KACHROO *et al* (1994) clonaram e caracterizaram um elemento transponível de *Magnaporthe grisea*, o *Pot*2. Esse elemento possui um tamanho

de 1857 pb, 43 pb de perfeitas repetições terminais invertidas (TIRs) e 16 pb de repetições diretas nos TIRs. Um grande ORF, potencialmente codificando para uma proteína semelhante à transposase, foi identificada. Essa região codificadora da proteína apresentou uma extensiva identidade à do *Fot1*, um elemento transponível de *F. oxysporum*. O elemento *Pot2* duplica o dinucleotídio TA no sítio de inserção alvo.

O elemento *Fot1* foi isolado por DABOUSSI *et al* (1992), esses autores analisaram mutantes *niaD* instáveis isolados de um transformante de *F. oxysporum* com o gene da nitrato redutase de *A. nidulans*. Esse transposon foi identificado como uma inserção no gene da nitrato redutase de dois desses mutantes. *Fot1* possui 1928 pb de comprimento, incluindo ITRs de 44 pb. Uma unidade de transcrição foi identificada ocupando a maior parte do elemento. Esse mRNA de 1,6 Kb codifica um polipeptídeo de 542 aminoácidos.

Outros transposons tem sido caracterizados em *Fusarium* sp. O transposon *Fot2* foi inicialmente identificado como um inserto de 2,1 Kb no gene *nia* de uma linhagem sem *Fot1* (DABOUSSI & LANGIN, 1994). Mais tarde, usando essa inserção como sonda, DABOUSSI & LANGIN (1994), identificaram seqüências hibridizando *Fot2* (em torno de 15) em uma linhagem F24 contendo cerca de 100 cópias dos elementos *Fot1*. Sequenciamentos preliminares indicaram que esse elemento possui ITRs perfeitos que estendem-se por pelo menos 66 pb com 25 pb igualando-se aos ITRs do *Fot1*. Esses autores consideraram que essa similaridade relativa indica que o *Fot1* e *Fot2* são relacionados.

De acordo com DABOUSSI & LANGIN (1994), os elementos *Fot1* e *Fot2*, bem como *Impala* e *hop* (todos de *F. oxysporum*), lembram

transposons bacterianos, sendo portanto transposons da Classe II. Esses elementos compartilham a mesma estrutura básica, isto é, duas repetições terminais invertidas (ITRs) de 27 a 96 pb de comprimento, flanqueando uma região central assumida por codificar uma transposase. Eles são flanqueados por uma duplicação direta (2 a 7 pb) da sequência hospedeira (o sítio alvo). Ainda segundo esses autores, esses elementos devem ser divididos em dois grupos. Os elementos *Fot1*, *Fot2* e *Impala* inserem-se em um sítio TA que aparece duplicado após a inserção. O elemento *hop* é distinto dos demais.

O elemento *Impala* foi isolado e caracterizado por LANGIN *et al* (1995), este elemento possui 1280 nucleotídeos e ITRs de 27 pb. A família *Impala* está presente em um baixo número de cópias (em torno de 6) e são altamente polimórficos, uma situação oposta à apresentada pela família *Fot1*. A cópia *Impala*-160 sequenciada parece ser *trans*-defectiva por causa da presença de dois “frameshifts” requeridos para obter uma proteína completa, entretanto é *cis*-ativa. O transposon *Impala*, da mesma forma que *Fot1*, *Fot2* e *hop*, foi isolado de um mutante instável para a nitrato redutase.

O elemento *hop* possui 3,5 Kb com ITRs perfeitos de 96 pb e ele produz uma duplicação de 7 pb no sítio alvo de inserção no gene *niaD*. (DABOUSSI & LANGIN, 1994). Transposons da Classe I, elementos similares aos retrotransposons, também foram observados em *F. oxysporum*.

JULIEN *et al* (1992), isolaram o *Foret1*, uma sequência de DNA repetitivo. Esse elemento tem características dos LTR-retrotransposons. Sequências internas homólogas aos genes retrovirais *pol* (transcriptase reversa,

protease, ribonuclease H) foram encontradas. A integrase não foi identificada no fragmento seqüenciado (elemento incompleto).

O elemento *palm*, segundo DABOUSSI & LANGIN (1994), é uma seqüência repetitiva isolada do genoma de patógenos de palmeiras. Ele está presente no genoma de outras linhagens de *F. oxysporum* e corresponde a um novo elemento transponível. O elemento completo até essa data não tinha sido isolado, mas sequenciamentos preliminares revelaram características dos LTR-retrotransposons.

ANAYA & RONCERO (1995), isolaram e caracterizaram um retrotransposon do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. O elemento, designado *skippy* (*skp*) é 7846 pb em comprimento, flanqueado por idênticas repetições terminais longas (LTR) de 429 pb mostrando características estruturais de retrovírus e retrotransposon LTRs. Esses autores encontraram duplicações no sítio alvo de 5 pb e identificaram dois ORFs. O primeiro ORF de 2562 pb apresentou homologia aos genes retrovirais *gag*. O segundo ORF de 3888 pb tem homologia à protease e à transcriptase reversa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico e Locais de coleta.

3.1.1. Linhagens de milho utilizadas para o isolamento de fungos

Foram utilizadas as populações de milho BR-105 e BR-106 (do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo - CNPMS/EMBRAPA). Estas populações apresentam elevada capacidade geral de combinação (NASPOLINI F^o. *et al.*, 1981). As populações estão descritas a seguir:

BR-105. A população BR-105 originalmente foi denominada de Suwan-DMR, tendo sido obtida na Tailândia através de seleção entre progênies S1. Foi introduzida no Brasil em 1976, onde já foi submetida a cinco ciclos de seleção com progênies de irmãos germanos. Esta população possui porte baixo, ciclo precoce, grãos alaranjados duros, e baixa depressão por endogamia (SOUZA Jr. *et al.*, 1993).

BR-106. A população BR-106 foi obtida pelo cruzamento do composto formado de variedades tardias de porte alto (Centralmex, Compostos Dentados de Maya) com o BR-108 (Tuxpeño-1) de ciclo precoce e porte baixo.

Após duas gerações de recombinação, seguiram-se três ciclos de seleção recorrente intrapopulacional para redução da altura da planta e espiga. Apresenta ciclo precoce, porte baixo, e grãos dentados de coloração amarela (SOUZA Jr. *et al.*, 1993). As linhagens de milho estão apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Relação das linhagens retiradas ao acaso das populações P1 (BR-105) e P2 (BR-106), empregadas no experimento

Linhagens homozigotas puras*
06-06-3A
06-08-1A
06-03-5B
05-17-1A
05-01-4B
05-05-2A

* onde o primeiro número corresponde à população (BR-106 ou BR-105), e os demais identificam a linhagem.

3.1.2. Locais de coleta

As plantas destas populações foram cultivadas durante os meses de Novembro/1993 a Agosto/1994, em dois experimentos idênticos, em dois locais diferentes, distando entre si por um raio de aproximadamente 10 Km²: Fazenda Areão (Local 1) e Caterpillar (Local 2), ambos no Campo Experimental da ESALQ/USP em Piracicaba, SP. Os tipos de solo das duas áreas experimentais são dados a seguir (segundo SOUZA, 1996). Fazenda Areão: Latossolo Vermelho Escuro Distrófico Ondulado, com 7% de declividade; Caterpillar: Latossolo

Vermelho Amarelo Distrófico, levemente ondulado, possuindo uma camada de areia na superfície e 3% de declividade

3.2. Isolamento e método de cultura

Foram isolados fungos endofíticos de sementes de cada linhagem. As sementes (em grupos de cinco) foram inicialmente lavadas em água corrente e escovadas antes da esterilização superficial. A esterilização da superfície foi realizada segundo SILVA *et al* (1992): imergiu-se as sementes em álcool 70% durante um minuto, hipoclorito de sódio 3% durante quatro minutos e álcool 70% durante trinta segundos. As sementes foram transferidas para placas de Petri contendo Meio Completo (MC) com Terramicina na concentração final de 100 µg/ml, e incubadas a 28 °C.

As placas foram monitoradas diariamente. Quando ocorreu o crescimento de fungos, esses foram purificados e transferidos para tubos inclinados contendo cerca de 5 ml de MC sendo classificados quanto ao gênero e quando possível, espécie. Após identificação, selecionou-se (por sorteio), cerca de 2 isolados de *Fusarium moniliforme* de cada linhagem de milho por local. Esses isolados foram utilizados em experimentos subsequentes.

3.3. Preparo de filtros, palitos de transferência e esterilização.

3.3.1. Filtros Buchner para filtração de micélio.

Estes foram preparados, mantendo-se em seu interior duas folhas de papel de filtro. Envolveu-se em papel de alumínio e papel comum e autoclavou-se por 15 minutos a 120°C.

3.3.2. Uso de palitos para transferência de colônias.

Palitos roliços adquiridos no comércio foram lavados em água por 6 vezes consecutivas e então esterilizados em forno por 3 horas. Depois de usados, foram novamente lavados, secos e esterilizados para uso posterior.

3.3.3. Esterilização e incubação

Os meios de culturas e as soluções foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 120°C (exceto nos casos assinalados). Os frascos que necessitaram ser utilizados e esterilizados, foram autoclavados a 120°C por 15 minutos. A temperatura de incubação foi de 26-28°C.

3.4. Meios de cultura de uso geral

3.4.1. Meio mínimo (MM) (PONTECORVO *et alii.*, 1953).

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄	0,001g
ZnSO ₄	0,001g
Glicose	10,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	1 litro
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.4.2. Meio completo sólido (MC) (PONTECORVO, *et al.* 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Foi adicionado ao meio mínimo:

Extrato de levedura	2,0g
Peptona	2,0g
Caseína hidrolisada	1,5g
Solução de vitaminas	1,0ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.4.3. Meio completo líquido

Preparado segundo o item 3.4.2, não sendo adicionado ágar

3.4.4. Meio mínimo líquido (PONTECORVO *et al.*, 1953)

Preparado segundo o item 3.4.1., não sendo adicionado ágar.

3.4.5. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	100,0mg
Ácido p-aminobenzóico	10,0mg
Biotina	0,2mg
Piridoxina	50,0mg
Riboflavina	100,0mg
Tiamina	50,0mg
Água destilada esterilizada	100,0ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e guardada em frasco escuro, no refrigerador a 4°C.

3.4.6. Meio Batata-Dextrose (BDA)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

Cortou-se a batata em pedaços de cerca de 1 cm², e deixou-se ferver em água destilada por cerca de 1 hora, filtrou-se e à água adicionou-se dextrose e completou-se a 1 litro.

3.4.7. Meio Batata-Dextrose (BDA) + Extrato de levedura + Caseína hidrolisada

Ao meio BDA foram acrescentadas 1g de Extrato de levedura e 1g de caseína hidrolisada.

3.4.8. Meio BDA suplementado líquido

Preparado segundo o item 3.4.6 sem ser adicionado ágar.

3.5. Soluções estoque de uso geral

3.5.1. Solução de EDTA 0,5M

EDTA	37,22g
H ₂ O	200ml

O pH foi ajustado para 7,5 com pastilhas de NaOH.

3.5.2. Solução de NaCl 5M

NaCl	58,44g
H ₂ O	200ml

3.5.3. Solução de NaOH (1 M)

NaOH	40g
------	-----

Água destilada	1000 ml
----------------	---------

3.5.4. Solução salina 0.85%p/v

NaCl	8,5g
Água destilada	1000ml

Foram distribuídos 9 ml por frasco, os quais foram autoclavados a 120°C (1,0 atm), por 20 minutos e mantidos em refrigerador a 4°C.

3.5.5. Solução SSC 20X

Foram dissolvidos 175,3 g de NaCl e 88,2 g de citrato de sódio em 800 ml de água. O pH foi ajustado para 7,0 com algumas gotas de NaOH 10N. O volume foi ajustado até 1 litro. Dispensou-se em alíquotas e autoclavou-se.

3.5.6. Solução SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)

Dissolveram-se 100 g de SDS em 900 ml de água. Aqueceu-se a 68°C para auxiliar na dissolução. O pH foi ajustado para 7,2 adicionando algumas gotas de HCl, o volume foi ajustado até 1 litro e dispensou-se em alíquotas.

3.5.7. Solução Denhardt's 100X

Ficoll 400	2,0 g
polyvinylpyrrolidone	2,0 g

BSA (Fração V, Sigma)	2,0 g
Água	100 ml

Manteve-se a -20°C em alíquotas de 10ml.

3.5.8. Solução de Acetato de Potássio 5M

KAc	98,15 g
Água	200 ml

O pH foi ajustado para 7,5 com KOH 1N. Esterilizou-se por filtração com membrana de 0,22µm.

3.5.9. Solução de Acetato de Amônio 7,5M

NaH ₄ OAc	57,83 g
Água	100 ml

Esterilizou-se por filtração.

3.5.10. RNase

Foi preparada na concentração de 10 mg/ml, em 10mM de Tris-HCl (pH=7,5) e 15mM de NaCl. Foi aquecida a 100°C, por 15 minutos e estocada em congelador a -20°C.

3.5.11. Solução de Brometo de Etídio (MANIATS et al, 1989)

Foi dissolvido 1,0% p/v de brometo de etídio em água destilada, agitado por várias horas e estocado à temperatura ambiente. No momento do uso 3µl desta solução foram adicionados à 100 ml de tampão TBE (1X) ou TAE (1X).

3.5.12. Tampão da amostra (6x)

Azul de bromofenol	250mg
Ficoll	15g
H ₂ O	100ml

3.6. Análise de variabilidade genética via RAPD

3.6.1. Clorofane

Fenol	50 %
Clorofórmio	50 %

3.6.2. Clorofil

Clorofórmio	240ml
Álcool Isoamílico	10ml

3.6.3. Fenol saturado (Modificado de Maniats et al., 1989) modificado

Foram dissolvidas em banho-maria 50g de fenol cristalizado, e adicionado um volume de tampão Tris-HCl 1,0 M (pH em torno de 10,0). Após

agitação por período suficiente para que o pH do fenol chegasse a 8,0 (em 1h aproximadamente), foi retirada a fase aquosa e adicionado um volume de tampão Tris-HCl 0,1M (pH 8,0), e colocado sob agitação. Em seguida, após retirada da fase aquosa foram adicionados 1/10 do volume final de tampão Tris-HCl 0,1M pH=8,0 e Hidroxiquinolina na concentração final de 0,1%. O fenol foi estocado em frasco escuro a 4⁰C.

3.6.4. Géis de agarose (p/v)

Componentes	Concentração final (%)	
	0,8g	0,8
Agarose A-0169 (Sigma)		
	1,4g	1,4
Tampão TEB 1X	100 ml	

3.6.5. Solução de dNTP

Foram utilizados dNTP's adquiridos na Pharmacia, em uma mistura de concentração igual a 20mM. Estes foram diluídos, em água destilada autoclavada, visando obter uma concentração estoque de 2,5 mM.

3.6.6. Enzima Taq-DNApolimerase (CENBIOT/RS)

A enzima Taq-DNApolimerase, constituída por um único polipeptídio de aproximadamente 86-90 KDa, foi fornecida em tubos de 500 unidades em 100 µl, ou seja 5 unidades por µl. Uma unidade incorpora 10 nmol de desoxirribonucleotídios em 30 minutos a 72⁰C.

3.6.7. Solução de Oligonucleotídios iniciadores (primers)

Foram utilizados oligonucleotídios fornecidos em "Kits" pela OPERON Technologies (USA). Adicionou-se água esterilizada aos oligonucleotídios que vêm na forma liofilizada (cerca de 14 µg aproximadamente), de modo a obter uma solução estoque na concentração de 50 µM. Desta solução estoque preparou-se soluções de 4 µM para uso.

3.6.8. Tampão de Reação (10x)

Este tampão é fornecido pela Pharmacia e é composto por 500 mM de KCl, 15 mM MgCl₂ e 100 mM de Tris-HCl (pH=8,0).

3.6.9. Tampão de corrida TEB (10x)

Trizma base pH,8.0	54,0g
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	27,5 g
EDTA 0,5M (pH 8,0)	20ml
H ₂ O	500ml

A solução foi autoclavada e guardada à temperatura ambiente. No momento do uso, foi diluída (1:10) com água Milli Q.

3.6.10. Tampão de Extração de DNA

SDS	1%
EDTA	25 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	200 mM

NaCl 200 mM

O tampão foi preparado momentos antes do uso.

3.6.11. Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl (pH=8,0) 10 mM

EDTA (pH=8,0) 0,1 mM

3.6.12. Extração de DNA (RAEDER & BRODA, 1985), modificado:

O fungo foi crescido em meio completo líquido (item 3.4.3) em placas de petri sem agitação a 28°C por quatro dias. O micélio foi coletado por filtração à vácuo, lavado com água destilada e macerado, na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. A cada grama de micélio foram acrescentados 4 ml de tampão de extração pré-aquecido (item 3.6.10). Após a homogenização incubou-se por 15 min. a 65-70°C. Um volume de clorofane (item 3.6.1) foi acrescentado e após misturar suavemente as fases, procedeu-se a centrifugação a 10000 g por 15 min. Foi coletada a fase aquosa a qual foi acrescentado um volume de clorofil (item 3.6.2) e a solução foi novamente centrifugada. Após coletar a fase aquosa, foi adicionado RNase (item 3.5.10) na proporção de 7µl/ml. Incubou-se em banho maria a 37°C por 1h. Adicionou-se 1 volume de clorofil e agitou-se. Centrifugou-se por cerca de 15 min. a 10.000 g. À fase aquosa foram adicionados vagarosamente dois volumes de etanol P.A. resfriado a -20°C (para a melhor precipitação do DNA o mesmo foi deixado nesta temperatura por aproximadamente 12 horas). A solução foi centrifugada a 10.000

g por 1 min., o sobrenadante foi desprezado, o precipitado lavado com álcool 70% e os tubos invertidos para a secagem do DNA (a 37°C por 1h ou à temperatura ambiente até estar seco). Após a secagem, o DNA foi ressuspenso cuidadosamente em 200 µl de tampão TE (item 3.6.11).

3.6.13. Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado por espectrofotometria (Spectrofotometer Hitachi U-3300). Foram realizadas leituras nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, onde a leitura à 260 nm multiplicada por 50 e multiplicada pelo fator de diluição fornece a concentração do DNA em µg/ml. A relação entre as leituras à 260 nm e 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) provê uma estimativa da pureza do ácido nucléico. Segundo MANIATIS *et al* (1989), preparações puras de DNA e RNA possuem OD_{260}/OD_{280} entre 1,8 e 2,0. Se existe contaminação com proteína ou fenol, a relação será menor do que estes valores.

A integridade do DNA foi verificada correndo-se o DNA em gel de agarose 0,8% (item 3.6.4). Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio (3-7µg/ml) e observado em transluminador de luz ultravioleta.

3.6.14. Amplificação do DNA (PCR)

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Perkin-Elmer-Cetus, sendo cada reação submetida a 40 ciclos após desnaturação inicial a 92°C de 4 min. Cada ciclo consistiu de 1 min. a 92°C, 1 min. e 30 seg. a 37°C e 2 min a 72°C. Os ciclos foram seguidos de uma extensão final de 3·min. a 72°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,4% (item 3.6.4) e posteriormente corados por 30 minutos com brometo de etídio (item 3.5.11). Por ser este um agente intercalante, o DNA pode ser evidenciado e fotografado sob luz UV em transiluminador. O DNA do fago lambda clivado com Hind III, foi utilizado como marcador de peso molecular.

3.6.15. Análise de Polimorfismo

A análise da variabilidade genética foi feita segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Utilizou-se o coeficiente Jaccard, que permite calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de banda). As bandas foram consideradas como variáveis enquanto as linhagens como unidades. A matriz binária de dados serviu para o cálculo do coeficiente, segundo a fórmula $J=M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos concordâncias negativas (SNEATH & SOKAL, 1973).

Desta forma, o coeficiente J leva em conta apenas as discordâncias e as concordâncias positivas, relativas à presença e à ausência de bandas, desconsiderando as concordâncias negativas. Quanto maior a semelhança entre duas linhagens, maior é o valor do coeficiente de similaridade e menor é a distância genética entre elas. A matriz das similaridades serviu como base para a técnica de agrupamento utilizando-se o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average), que é um modelo de agrupamento

hierárquico, que permite a construção de dendrogramas (SNEATH & SOKAL, 1973). Matrizes e dendrogramas foram elaborados com auxílio do programa NTSYS-PC (ROHLF, 1988).

3.7. Transformação genética

3.7.1. MgSO_4 -1,2M

Ao MgSO_4 -1,2M, adicionou-se Na_2HPO_4 , 10mM. acertou-se o pH à 5,8 com H_3PO_4 (diluído 1/10). Filtrou-se com filtro milipore de 0,20 μm

3.7.2. MS

MOPS-Sorbital	0,6M
sorbitol	0,6M
MOPS	10mM

pH 6,3

Ajustou-se o pH com NaOH e autoclavou-se

3.7.3. TMS

Sorbitol	1 M
MOPS	10 M

Ajustou-se o pH a 6,3 com NaOH e autoclavou-se

3.7.4. TMS

Ao TMS adicionou-se CaCl_2 à concentração final de 40mM

3.7.5. TRIS-EDTA CaCl_2

TRIS 10mM

EDTA 1mM

CaCl_2 40mM

Ajustou-se o pH à 7,5 e autoclavou-se

3.7.6. PEG 60%

À solução MS adicionou-se PEG 4000 Koch Light à concentração final de 60%, e filtrou-se em um filtro milipore de 0,45 μm .

3.7.7. Soluções usadas na transferência de DNA para a membrana de nylon.

3.7.7.1. Solução de depuração (HCl 0,25N)

Adicionou-se 20ml de HCl fumegante (12,5N/ 38%) a 980 ml de água destilada.

3.7.7.2. Solução de denaturação

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5M

3.7.7.3. Solução de neutralização

NaCl	1,5M
Tris	0,5M
EDTA	1mM

3.7.8. Soluções de Tratamento de Membranas para Hibridização *In Situ*.

3.7.8.1. Solução 1.

NaOH	0,5 M
SSC	5 X

3.7.8.2. Solução 2

Tris HCl pH 7,5	0,5 M
SSC	10 X

3.7.9. Solução de Hibridização

Denhardt 100X	10 ml
SSC 20X	60 ml
SDS 10%	10ml
Água destilada	120ml

Dividiu-se em alíquotas de cerca de 33ml e conservou-se a menos 20°C

3.7.10. Soluções de lavagem

3.7.10.1. Solução 1

SSC	2X
SDS	0,1%

3.7.10.2. Solução 2

SSC	0,2X
SDS	0,1%

3.7.11. Soluções de deshibridização

3.7.11.1. Solução 1

NaOH	0,4M
------	------

3.7.11.2. Solução 2

SSC	0,1M
SDS	0,1%
Tris HCl (pH 7,5)	0,2M

3.7.12. Tampão de Extração de DNA

EDTA	50mM
SDS	0,2%

Acertou-se o pH para 8,5

3.7.13. Tampão TE

Tris HCl	10mM
EDTA, pH 8,0	1mM

3.7.14. Tampão Tris-Acetato [TAE (50 X)]

Tris base	242g
ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (PH8,0)	100 ml
Completo-se até 1 litro com água destilada	

3.7.15. Géis de agarose (p/v)

Componentes	Concentração final (%)	
	0,8g	0,8
Agarose	1,0g	1,0
Tampão TAE 1X	100 ml	

3.7.16. Obtenção de mutantes (*nia⁻*)

Repicou-se colônias de *F. moniliforme* em placas de BDA contendo 1,5% de clorato de potássio (KClO₃). Inicialmente as colônias apresentaram um crescimento bastante reduzido, mas após cerca de 7-10 dias setores vigorosos (de crescimento rápido) ocorreram. Esses foram transferidos para um meio mínimo (MM). As colônias que tiveram um crescimento rarefeito, sem micélio aéreo, foram consideradas mutantes para a utilização do nitrato. A classificação desses mutantes foi baseada em testes de crescimento em MM contendo diferentes fontes de nitrogênio segundo a Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Identificação de mutantes de *F. moniliforme* baseado em testes de crescimento (modificada de KLITTICH & LESLIE, 1988)

<i>Fusarium</i>		<i>Neurospora</i>	<i>Aspergillus</i>	função	Fontes de nitrogênio				
loco		loco	loco		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	HX	UA
<i>nit</i> 1		<i>nit</i> 3	<i>nicaD</i>	Gene estrutural para a nitrato redutase	+	-	+	+	+
<i>nit</i> 3		<i>nit</i> 4	<i>nirA</i>	Gene regulatório	+	-	-	+	+
<i>nit</i> 2, 4-7		<i>nit</i> 1, 7-9	<i>cnxABC</i> , E-H	Genes do cofator molibdênio ¹	+	-	+	-	+
Selvagem					+	+	+	+	+

HX=hipoxantina; UA= ácido úrico; (-)= crescimento rarefeito; (+)= crescimento igual ao selvagem

1. Esse tipo de mutante será, em geral, denominado como *nitM*

3.7.17. Meios seletivos utilizados na obtenção e identificação dos mutantes *nia⁻*

3.7.17.1. Meio Basal

Sacarose	30g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
agar	15g
Solução de Elementos Traço	0,2ml
água (completou-se até)	1l

3.7.17.1.1. Solução de Elementos Traço

ácido cítrico	5g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	1g
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,25g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,05g
H ₃ BO ₄	0,05g
NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0,05g
água (completou-se até)	95ml

3.7.17.2. Meio Mínimo (=Meio Nitrato)

NaNO ₃	2g
Meio Basal	1l

3.7.17.3. Meio BDA+Clorato de Potássio

Batata	250g
Dextrose	20g
Ágar	15g
Clorato de Potássio	15g
Água Destilada	1l

Cortou-se a batata em pedaços de cerca de 1cm², e deixou-se ferver em água destilada por cerca de 1 hora, filtrou-se e à água adicionou-se os demais componentes e completou-se a 1 litro. O pH foi corrigido para 6,6.

3.7.17.4. Meio nitrito

NaNO ₂	0,5g
Meio Basal	1l

3.7.17.5. Meio Hipoxantina

Hipoxantina	0,2g
Meio Basal	1l

3.7.17.6. Meio Amônio

Tartarato de amônio	1g
Meio basal	1l

3.7.17.7. Meio Ácido úrico

Ácido úrico	0,2g
-------------	------

Meio basal

11

3.7.18. Obtenção de protoplastos

Inoculou-se em 10ml de Meio Batata-Dextrose (BDA) complementado com extrato de levedura (1%) e caseína hidrolisada (1%), esporos em uma quantidade determinada. Incubou-se por cerca de 17h à 26°C em agitação suave (150 rpm). Centrifugou-se por 10 min. em tubo de 50 ml a 3000 g, suspendeu-se o precipitado em 10 ml de estabilizador (MGSO₄ 1,2M. pH 5,8). Repetiu-se a centrifugação. Ressuspendeu-se o precipitado em 10 ml de MGSO₄ 1,2M/ Na₂HPO₄ 10 mM, pH 5,8. Adicionou-se glucanex na razão de 500 mg/10 ml de estabilizador. Incubou-se cerca de 2h à 2h30 em agitação suave (150 rpm). Após a digestão, os protoplastos foram purificados: Transferiu-se a solução de protoplastos para um tubo corex contendo 10 ml de MS (MOPS 10 mM/Sorbitol 0,6M, pH6,3), os protoplastos foram adicionados delicadamente na borda do tubo evitando-se ao máximo a mistura das soluções. Centrifugou-se por dez minutos à 3000 g. Recuperou-se a banda leitosa da interface com a ajuda de uma pipeta Pasteur com a ponta dobrada. Logo após esta, procedeu-se a uma segunda purificação, onde colocou-se essa banda leitosa delicadamente sobre uma solução de sacarose 30% em um tubo de 50 ml respeitando-se a proporção de 1:7, respectivamente. Centrifugou-se a 3000 g por 10 minutos. Transferiu-se toda a primeira fase para um novo tubo. Adicionou-se 5 ml de estabilizador TMS (Sorbitol 1M, MOPS 10 mM, pH 6,3) e centrifugou-se por 5 minutos à 3000 g, lavou-se mais duas vezes, ressuspendendo-se em um volume final 200 µl de TMSC (TMS + CaCl₂ 40 mM). Estimou-se o número de protoplastos após uma diluição de 1/100 em TMSC.

3.7.19. Transformação genética

Repartiu-se os protoplastos em tubos Eppendorf à razão de 100 μl /tubo, com cerca de 4.10^7 protoplastos. Deixou-se 20 minutos no gelo. Adicionou-se 5 μg de plasmídeo em 60 μl de Tris-EDTA CaCl_2 . Misturou-se os protoplastos e o DNA. Deixou-se 20 minutos no gelo. Adicionou-se 160 μl de PEG 60%. Misturou-se suavemente. Deixou-se 15 minutos à temperatura ambiente. Ajustou-se 1ml de TMSC. Centrifugou-se à 6000 g por 5 minutos. Retirou-se todo o PEG. Ressuspendeu-se o precipitado com 200 μl de TMSC. Repartiu-se os protoplastos em top ágar Oxoid (0,4%) e semeou-se em placas contendo MM + sacarose 20% + ágar Oxoid 1,25%. Quando a marca de seleção foi a hygromicina, após 17h de incubação adicionou-se um TOP contendo 2000 μg de hygromicina. Se a linhagem a transformar com a marca de seleção hygromicina era nia, também adicionou-se uma fonte de nitrogênio.

3.7.20. Plasmídios utilizados

Figura 3.1 Representação esquemática dos plasmídios utilizados nos experimentos de transformação genética

Plasmídio pNOM 102 (7,2 Kb)

Plasmídio pnH24

pIEH2/pIAH2

P11 Δ Nde1::Fot3

Impala 160

Figura 3.1. Representação esquemática dos plasmídios utilizados nos experimentos de transformação genética (continuação)

3.7.21. Cotransformação genética

Distribuiu-se os protoplastos em tubos Eppendorf à razão de 100 µl/tubo, com cerca de $4 \cdot 10^7$ protoplastos. Deixou-se 20 minutos no gelo. Adicionou-se quantidades equimolares (5 µg) dos plasmídios em 60 µl de Tris-EDTA CaCl_2 . Misturou-se os protoplastos e o DNA. Deixou-se 20 minutos no gelo. Adicionou-se 160 µl de PEG 60%. Misturou-se suavemente. Deixou-se 15 minutos à temperatura ambiente. Ajustou-se 1ml de TMSC. Centrifugou-se à 6000 g por 5 minutos. Retirou-se todo o PEG. Ressuspendeu-se o precipitado com 200 µl de TMSC. Distribuiu-se os protoplastos em top ágar Oxoid (0,4%) e semeou-se em placas contendo MM + sacarose 20% + ágar Oxoid 1,25%.

3.7.22. Extração de DNA (mini-prep)

Frascos Roux contendo 100 ml de meio líquido (item 3.4.7) foram inoculados com cerca de 10^7 esporos. Após 72-96 horas de crescimento, o micélio foi coletado por filtração, lavado com água destilada esterilizada e liofilizado. O micélio foi mecânicamente reduzido a pó, em um eppendorf, com o emprego de pinça milipore. O pó foi suspenso em tampão (item 3.7.12) e acrescentado proteinase K (10mg/ml) na razão de 10µl/ ml tampão. Após incubações sucessivas de 30 min/37°C e 15 min/70°C acrescentou-se 1/10 do volume de acetato de potássio 5M e incubado 30 min. no gelo. O sobrenadante foi coletado por centrifugação a 12000 g por 15 min, e tratado três vezes com um volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (48-48-4) saturado com 1 M de Tris, pH 8,0. Após isso o sobrenadante foi misturado com clorofórmio-álcool isoamílico (48-4) e centrifugado a 12000g por 5 min. Ao sobrenadante foi

acrescentado $\frac{1}{2}$ volume de acetato de amônio 7,5 M e deixado 15 min. no gelo. Centrifugou-se a 12000g por 15 min a 4°C, o sobrenadante misturado com um volume de isopropanol e centrifugado a 12000g por 15 min. O precipitado (DNA) foi ressuspendido em tampão TE (item 3.7.13), acrescentado 2 vol. de álcool etílico, centrifugado, seco em centrífuga a vácuo e ressuspendido em 200 μ l de TE.

3.7.23. Digestão Enzimática do DNA

Em um tubo eppendorf de 1,5 ml, adicionou-se 100 μ l de uma minipreparação de DNA (item 3.7.22), cerca de 10 μ g de DNA. Adicionou-se 20 μ l de Tampão da Enzima 10X, 5 μ l de RNase (item 3.5.10), 10 μ l de Enzima EcoRI na concentração de 10 u/ μ l (usa-se 10 unidades de enzima por μ g de DNA) e 65 μ l de água MilliQ esterilizada. Incubou-se por 3h a 37°C. Após esse período fez-se um minigel para verificar a digestão. Estando o DNA bem digerido, adicionou-se à reação de digestão $\frac{1}{2}$ vol. (100 μ l) de acetato de amônio 7,5M e precipitou-se o DNA com dois volumes de etanol. Deixou-se a -80°C durante 10 min., centrifugou-se em uma centrífuga refrigerada, desprezou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado (DNA) em uma centrífuga a vácuo. Ressuspendeu-se em 20 μ l de TE, adicionou-se 2 μ l de tampão de corrida e carregou-se um gel de agarose com todo o volume (22 μ l).

3.7.24. Hibridizações

3.7.25. Hibridização “ Southern blotting”

O DNA digerido com EcoR1 foi separado em gel de agarose 0,8%. A transferência do DNA do gel para a membrana de nylon (Hybond N, Amersham UK) foi feita usando-se um sistema de transferência a vácuo (LKB 2016 VACUGENE BROMMA VACUUM BLOTTING UNIT). A transferência foi feita seguindo-se o protocolo a seguir:

- 2 X 4 minutos sob uma solução de depuração (item 3.7.7.1);
- 20 minutos em uma solução de desnaturação (item 3.7.7.2);
- 5 minutos em uma solução de neutralização (item 3.7.7.3)
- 30 minutos em uma solução de SSC 20X (item 3.5.5)
- secagem da membrana e fixação do DNA na luz ultravioleta durante 5 minutos.

Após essas etapas a membrana foi então pré-hibridizada em solução de hibridização pré-aquecida (item 3.7.9) durante pelo menos duas horas, a 65°C em forno de hibridização. Após esse período adicionou-se a sonda marcada com ^{32}P e deixou-se sob agitação leve durante cerca de 12-18 h. Após o período de hibridização a membrana foi lavada diversas vezes. Foram feitas 3 lavagens de 30 minutos cada com a solução de lavagem 1 (item 3.7.10.1.) e uma lavagem final de 30 minutos com a solução de lavagem 2 (item 3.7.10.2). A membranas foi deixada secar sobre papel filtro à temperatura ambiente, envolta em plástico e colocada em cassete em contato com filme de raio-x. Foi deixada sob exposição a -80°C durante período determinado pela intensidade de radioatividade da sonda (12-18 horas até 7 dias). O filme foi então revelado.

3.7.26. Hibridização *In Situ*

Micélios de transformantes foram inoculados em membranas Amersham milimetradas (as membranas estavam em placas de meio seletivo contendo hygromicina B na concentração final de 18,2µg/ml) e incubados a 26°C por 24 h. Após esse período as membranas foram coletadas e tratadas com a solução 1 (item 3.7.8.1) por 30 minutos e, com a solução 2 (item 3.7.8.2) por mais 30 minutos, ambas sob agitação. As membranas foram secas a 37°C e fixadas com luz ultravioleta. As membranas foram então pré-hibridizadas em solução de hibridização pré-aquecida (item 3.7.9) durante pelo menos duas horas, a 65°C em forno de hibridização. Após esse período adicionou-se a sonda marcada com ³²P e deixou-se sob agitação leve durante cerca de 12-18 h. Após o período de hibridização a membrana foi lavada diversas vezes. Foram feitas 3 lavagens de 30 minutos cada com a solução de lavagem 1 (item 3.7.10.1.) e uma lavagem final de 30 minutos com a solução de lavagem 2 (item 3.7.10.2). As membranas foram deixadas secar sobre papel filtro à temperatura ambiente, envoltas em plástico e colocadas em cassetes em contato com filmes de raio-x. Foram deixadas sob exposição a -80°C durante período determinado pela intensidade de radioatividade da sonda (12-18 horas até 7 dias). O filme foi então revelado.

3.7.27. Preparo das sondas

O DNA foi marcado radioativamente por “random priming” com o kit T7 Quick Prime da Pharmacie Biotech. Inicialmente desnaturou-se o DNA (50 a 100 ng, em um volume total de 10 μ l) 5 minutos à 95°C, em seguida centrifugou-se com um pulso rápido e manteve-se no gelo. Efetuou-se a reação enzimática adicionando-se aos 10 μ l de DNA, 27 μ l de água Mili-Q, 10 μ l de tampão de reação (dATP, dTTP, dGTP e sais), 1 μ l de enzima polimerase T7 (misturando-se bem com a micropipeta), 2 μ l de dCTP marcado (colocando-se no fundo sem tocar na borda do tubo Eppendorf e não misturando com a micropipeta para evitar contaminação da mesma). Misturou-se em vórtex brevemente, centrifugou-se com um pulso rápido e incubou-se a 37°C por 45 min. a 1 hora. A reação foi parada e o DNA precipitado adicionando-se ao tubo 5 μ l de EDTA 0,2M, 50 μ l de Acetato de Amônio 7,5M, 20 μ l de “carrier DNA” (DNA de esperma de salmão) e 300 μ l de etanol 100%. Misturou-se em um vórtex e centrifugou-se em seguida por 5 minutos. Separou-se o precipitado (DNA marcado) do sobrenadante e comparou-se as atividades com o auxílio de um contador geiger: quando o precipitado continha de 50 a 70% da radiação em relação ao sobrenadante a sonda estava boa para uso.

3.7.28. Deshibridização

As membranas foram reutilizadas em experimentos de hibridização com diferentes sondas, facilitando dessa forma a análise molecular dos transformantes (GUS, *Nia*, IMPALA/ HYGRO). Essas foram inicialmente incubadas à 45°C por 30 minutos com a solução de deshibridização 1 (item

3.7.11.1). Após esse período substituiu-se a solução 1 pela solução 2 (item 3.7.11.2) incubando-se por mais 30 minutos à 45°C. A membrana foi deixada a secar à temperatura ambiente sobre papel filtro, checada por radioatividade com um contador geiser, embrulhada em plástico e guardada a -20°C até o momento do uso.

3.7.29. PCR

O PCR foi realizado segundo Saiki *et al* (1988) em um Termociclador Biomed 60 (Braun), usando-se 100 ng de DNA total genômico e 1 unidade de Taq Polymerase, em um volume final de 100µl. Foram realizados 30 ciclos de reação, sendo cada ciclo de 1 min 30 seg a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min 30 seg a 72°C; havendo um ciclo final de 15 min a 72°C. Um décimo da reação de amplificação foi separada em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio.

3.7.30. Análise Qualitativa da expressão do gene da beta-glucuronidase nos transformantes.

Amostras de cerca de 1cm² de micélio de colônias jovens foram colocadas em poços de placa Elisa contendo 90µl de MM mais 10µl MUG (item 3.7.30.1) por poço. A placa Elisa foi colocada sob incubação a 37°C no escuro e, após duas horas e meia, analisada sob transluminador (UV).

3.7.30.1. MUG (10mM)

MUG	35, 23mg
Tampão fosfato pH 7,0 (item 3.7.33.2)	10ml

3.7.31. Análise histoquímica da atividade GUS

3.7.32. Esterilização (RODRIGUES, 1996) modificado, inoculação e cultivo das sementes de milho

As sementes foram lavadas em água corrente e escovadas, em seguida, foram colocadas em Tween 80 0,1% e mantidas sob agitação durante 30 minutos com uma troca da solução após 15 minutos. Terminada essa lavagem, as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar e esterilizadas. A esterilização foi realizada imergindo-se as sementes em álcool 70% durante um minuto, hipoclorito de sódio 3% durante vinte e cinco minutos e álcool 70% durante 30 segundos. Após a esterilização as sementes foram lavadas em água destilada estéril e transferidas para placas esterilizadas contendo algodão embebido em água (ambos esterilizados). As sementes foram incubadas em estufa a 26°C durante trinta e duas horas. As sementes em início de germinação foram assepticamente imersas em uma solução de esporos na concentração de $1,6 \times 10^7$ esporos/ml e imediatamente transferidas para frascos contendo meio MS (item 3.7.32.1). As sementes foram incubadas em câmara de incubação a 26°C com fotoperíodo de treze horas com luz e 11 horas no escuro. Após dez dias de incubação, as raízes das plantas foram retiradas, lavadas, coradas e visualizadas segundo o item 3.7.33.

3.7.32.1. Meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

NH_4NO_3	1650 mg
KNO_3	1900 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg
KH_2PO_4	170 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8 mg
Na_2EDTA	37,3 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6 mg
H_3BO_3	6,2 mg
KI	0,83 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg
mio-Inositol	100 mg
Ac. Nicotínico	0,5 mg
Piridoxina	0,5 mg
Tiamina	0,1 mg
Glicina	2,0 mg
Sacarose	30.000,0 mg
Água destilada esterilizada	1000 ml

Acertou-se o pH para 5,8 com NaOH e HCl 0,1N. O meio foi solidificado adicionando-se 1,5 g/l de Phytigel (sigma). Autoclavou-se a 120°C por 15 minutos. Distribuiu-se em frascos (10 ml por frasco).

3.7.33. Coloração para a atividade GUS

As raízes foram lavadas em água destilada esterilizada e transferidas para tubos de 50 ml contendo a solução de coloração (item 3.7.33.1) e incubadas a 37°C no escuro durante cerca de doze horas. Após esse período foram fixadas durante cerca de cinco horas em tampão cacodilato 0,1M (item 3.7.33.3). As raízes foram então lavadas e então visualizadas e fotografadas em microscópio ótico. Algumas raízes ainda foram clarificadas em hipoclorito de sódio 2,5% por trinta minutos.

3.7.33.1. Solução de coloração para GUS (WILSON *et al.*, 1995), modificado.

EDTA	1mM
Triton X-100	0,1%
SDS	0,1%
X-gluc	100µg/ml

Essa solução foi feita em tampão fosfato (item 3.7.33.2) para um volume final de 10 ml, sendo que o X-gluc foi preparado adicionando-se 1mg em 1ml tampão fosfato pH 7,0 (tendo sido adicionada uma gota de formamida para dissolver o X-gluc).

3.7.33.2. Tampão fosfato pH 7,0

Misturou-se 40 ml da solução 1(item 3.7.33.2.1) em 60 ml da solução 2 (item 3.7.33.2.2), acertou-se o pH para 7,0 e autoclavou-se.

3.7.33.2.1. Solução 1

KH_2PO_4	9,08g
Água	1l

3.7.33.2.2. Solução 2

Na_2HPO_4	23,88g
Água	1l

3.7.33.3. Tampão cacodilato 0,1 M

Foi preparado a partir de uma solução estoque de 0,2M:

Solução estoque 0,2M

Cacodilato de sódio	42,8g
Água destilada q.s.p.	1000,0ml

O cacodilato de sódio foi dissolvido em 900,0ml de água destilada, o pH foi ajustado para 7,2 com 1N HCl e o volume foi completado para 1000,0ml com água destilada. Esta solução foi mantida a 4°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento

O número de sementes que apresentaram fungos endofíticos em relação ao total de sementes ensaiadas, proporciona o cálculo da percentagem de colonização de sementes. Esse valor foi computado para cada linhagem de milho em separado. Com base nos números totais de sementes infectadas e ensaiadas, calculou-se as percentagens de colonização total para cada população de milho em separado e para cada local. Esses resultados estão sumarizados nas tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1. Percentagens de colonização das linhagens de milho por fungos endofíticos em cada local. (%)

Linhagens de milho	Local	
	Areão	Caterpillar
06-06-3A	32	15
06-08-1A	74	32
06-03-5B	35	35
05-17-1A	65	25
05-01-4B	50	20
05-05-2A	60	10

Tabela 4.2. Percentagens de colonização das populações de milho por fungos endofíticos (%).

Populações de milho	Local	
	Areão	Caterpillar
BR 106	48	29
BR 105	58	18
Total geral	54	23

Esses resultados de isolamento (tabelas 4.1 e 4.2; figura 4.1) contrastam com os obtidos por FISHER *et al.* (1990). Eles observaram uma percentagem de colonização de sementes de milho de somente 7% quando as sementes eram prontamente ensaiadas após sua retirada da espiga; 6% quando as sementes retiradas das espigas eram deixadas secando por oito semanas e, 68% quando as sementes ensaiadas eram aquelas estocadas para o plantio. Nos três casos não foi isolada qualquer linhagem de *F. moniliforme*. Isolados do gênero *Fusarium* spp. só vieram a ocorrer nas sementes usadas no plantio

Do total de fungos isolados de cada linhagem, após a identificação dos mesmos, verificou-se o gênero de fungo que apresentava uma maior ocorrência. Esse gênero (*Fusarium* sp.) teve a sua percentagem de ocorrência calculada em relação ao total de fungos isolados. Os outros dois gêneros de fungos que apareceram foram: *Penicillium* sp. e *Acremonium* sp. Estes dois, a título de simplificação, na apresentação dos dados, foram agrupados como “outros”.

Figura 4.1. Colonização das populações de milho por fungos endofíticos nos dois locais: Areão (local 1) e Caterpillar (local 2)

Esses resultados são semelhantes ao observado por SILVA *et al.* (1992). Esses autores, trabalhando com sementes de milho e plantas inteiras com 52 dias de idade, da variedade Piranão, provenientes de dois distritos da periferia de Piracicaba, isolaram diversos fungos endofíticos. Dentre os mesmos, aqueles de maior incidência foram o *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Syncephalastrum* spp. e *Aspergillus* spp.

As percentagens de fungos endofíticos encontrados nos dois locais estão apresentadas nas tabelas 4.3 e 4.4. Os dados dessas tabelas foram utilizados para a plotagem dos gráficos mostrados nas figuras 4.2 e 4.3,

repectivamente. A tabela 4.5 apresenta a percentagem de fungos encontrados por local de isolamento.

Tabela 4.3. Percentagem de fungos endofíticos por linhagens de milho encontrados no local 1 (Areão).

Linhagens de milho	Percentagem de fungos (%)	
	<i>Fusarium</i>	Outros
06-06-3A	100	0
06-08-1A	86	14
06-03-5B	57	43
05-17-1A	54	46
05-01-4B	80	20
05-05-2A	0	100

Tabela 4.4. Percentagem de fungos endofíticos por linhagens de milho encontrados no local 2 (Caterpillar).

Linhagens de milho	Percentagem de fungos (%)	
	<i>Fusarium</i>	Outros
06-06-3A	33	67
06-08-1A	100	0
06-03-5B	29	71
05-17-1A	100	0
05-01-4B	75	25
05-05-2A	0	100

Quando analisa-se os dados contidos nas tabelas 4.3 e 4.4, observa-se que tanto no local 1 quanto no local 2, a linhagem de milho 05-05-2A não estava infectada por isolados do gênero *Fusarium*. Esse resultado, embora negativo no que concerne à presença de *F. moniliforme*, é positivo quando visto sob o prisma da interação endófito-planta. A nível de espécie, esse resultado reforça a hipótese de que o genótipo da planta hospedeira “seleciona” a sua micoflora. Essa especificidade do endófito em relação ao hospedeiro, ao nível de gênero ou família, foi destacada por diversos autores (CLAY, 1986; STONE, 1986; PETRINI, 1986).

Figura 4.2. Relação entre as linhagens de milho e a frequência dos fungos isolados na região de Areão.

Figura 4.3. Relação entre as linhagens de milho e a frequência dos fungos isolados na região de Caterpillar.

Tabela 4.5. Percentagem de fungos endofíticos em sementes de milho por local de isolamento.

Locais	Percentagem de fungos (%)	
	<i>Fusarium</i>	Outros
Areão	60	40
Caterpillar	63	37

Figura 4.4. Distribuição de fungos endofíticos em sementes de milho nos dois locais.

Como pode ser observado pela tabela 4.5 e figura 4.4, a frequência com que o gênero *Fusarium* ocorreu, manteve-se praticamente a mesma nos dois locais de isolamento (em torno de 60%), embora as percentagens de colonização nos locais 1 e 2 tenham sido bastante diferentes (54 e 23% respectivamente). Isso indicaria uma influência do ambiente em relação à infecção das plantas (percentagem de colonização). Contudo, as características dos locais de plantio não devem afetar o “equilíbrio” na distribuição dessas populações de

fungos (*Fusarium* e outros) nas plantas. Deve haver uma grande especificidade de *F. moniliforme* em relação ao milho, sendo o endófito de maior frequência.

Esses dados são semelhantes aos obtidos por SOUZA (1996). Esse pesquisador, trabalhando com as mesmas linhagens de milho, cultivadas em experimentos idênticos, nos mesmos locais (Areão e Caterpillar), verificou uma diferença entre os dois locais em relação ao número de bactérias endofíticas presentes nos mesmos. SOUZA (1996), considerou que dentre os fatores que poderiam estar influenciando essa diferença, destacariam-se alguns fatores ambientais, tais como diferenças climáticas referentes a macroclima e microclimas; assim como variações edáficas, além dos fatores genotípicos dos hospedeiros e endófitos. O autor assinala que o fato das duas áreas experimentais situarem-se na mesma região, distando entre si por um raio de aproximadamente 10 Km², descartaria a possibilidade de grandes variações climáticas influenciando os resultados. O mesmo não ocorrendo com relação aos fatores edáficos, visto que os tipos de solos das duas áreas experimentais são diferentes.

Os resultados aqui apresentados (tabela 4.2), corroboram em parte a hipótese aventada por SOUZA (1996) de que as diferenças entre locais seriam devidas principalmente à influência de fatores ambientais na associação endófito-hospedeiro, neste caso possivelmente devido à diferença no tipo de solo dos dois locais. Ainda segundo esse autor, a associação endófito-hospedeiro poderia estar sendo influenciada em sua especificidade, por um ou mais fatores ambientais, os quais influenciariam fatores genéticos no hospedeiro e consequentemente na interação deste com o endófito. Os dados apresentados na tabela 4.5 não ratificam essa última assertiva. Pelo contrário, indicam que não há uma influência dos locais, do ambiente, na especificidade dos fungos em relação à

planta. Em razão de terem sido mantidas as proporções de *Fusarium* dentro do conjunto de endófitos de milho. Ou seja, o ambiente influenciou quantitativamente as linhagens de fungo, mas não qualitativamente (a distribuição dos gêneros no conjunto de endófitos). De qualquer forma, esse é um tópico que demanda mais estudos para a sua melhor compreensão.

SIEBER *et al.* (1988), demonstraram que as populações de fungos endofíticos são significativamente influenciadas pelas diferentes condições climáticas dos ambientes onde se encontram os hospedeiros. Em ordem de importância, influenciariam a população de fungos, quantitativamente e qualitativamente, em ordem decrescente: órgãos da planta, ambiente, período vegetativo e por último a cultivar.

Os resultados de isolamento das linhagens de milho (tabelas 4.1 a 4.5), mostram uma colonização sistemática de milho por *F. moniliforme*. Conforme KEDERA *et al.* (1994), a recuperação consistente de *F. moniliforme* de tecidos sugere que ele coloniza as plantas sistematicamente e deve ser considerado um endófito. Ainda segundo esses pesquisadores, quando linhagens de *F. moniliforme* foram usadas para infestar sementes, uma alta proporção dos isolados recuperados das plantas maduras (plantas resultantes dessas sementes) foram idênticas às linhagens usadas para inoculá-las. KEDERA *et al.* (1994), consideraram que esse fato indicaria que o fungo (*F. moniliforme*) é sistêmico em milho e, as sementes são uma importante fonte de inóculo. Essas seriam duas características importantes de uma associação endofítica. Esses autores ainda destacam que, de todas as plantas ensaiadas, incluindo-se os controles não inoculados, eles recuperaram outras linhagens de *F. moniliforme*. O fato desse

autores terem encontrado linhagens “exógenas” nas sementes (diferentes daquelas por eles inoculadas), indicaria a ocorrência de outras formas de infecção.

Dentro desse contexto, AMOAH *et al.* (1996), relataram a existência de três caminhos principais pelos quais o milho poderia vir a ser infectado sob condições de campo. A principal fonte de infecção do milho por *Fusarium* seria por meio de sementes infectadas. Se a plântula não é morta, o caule deve então ser subsequenteiramente infectado sistematicamente. O milho também pode ser infectado por esporos trazidos pelo vento alocando-se entre a bainha da folha e o colmo, onde os esporos germinariam e penetrariam no caule. O caule, a espiga e subsequenteiramente a semente, também devem se tornar infectadas sistematicamente. A infecção também deve ser realizada por meio de conídios trazidos pelo vento, germinando sobre e crescendo sob as sedas do milho, vindo a infectar a espiga.

Atualmente, alguns autores vêm discutindo a questão sobre a possibilidade dos fungos do gênero *Fusarium*, serem endófitos, patogênicos, ou patogênicos latentes. LESLIE *et al.* (1990), relataram que *Fusarium* spp. são associados com plantas cultivadas sintomáticas e assintomáticas. Sendo a colonização sistêmica mesmo em plantas assintomáticas. Para esses autores, essa associação tornaria difícil discernir se o fungo seria um agente causal de doença, um invasor secundário ou um endófito. Em vista disso, quando se analisa essa questão, deve-se observar antes de mais nada a forma com que os isolados foram obtidos (o tipo de esterilização superficial dos tecidos da planta), a condição da planta (se era assintomática), as características das linhagens de fungos endofíticos (variabilidade, produção de toxinas e etc.) e, por último, a relação dessas linhagens com as plantas e com outros microrganismos que venham constituir a micoflora da planta.

dessas linhagens com as plantas e com outros microrganismos que venham constituir a micoflora da planta.

Em relação a essa questão, deve-se destacar que o isolamento das linhagens de *F. moniliforme*, nesta tese, foram feitas após uma esterilização da superfície das sementes (item 3.2). As condições de esterilização haviam sido previamente utilizadas por SILVA *et al.* (1992) para o isolamento de fungos endofíticos de milho, e por FISHER *et al.* (1992).

FISHER *et al.* (1992), isolaram bactérias e fungos endofíticos de plantas de milho assintomáticas coletadas no campo. Para tanto, eles realizaram uma esterilização da superfície de folhas, caule e sementes de milho pela imersão sequencial em etanol 75% por 1 min., hipoclorito de sódio (3-5%) por 3 min e etanol 75% por 0,5 min. Esses autores consideraram que os isolados de *Fusarium* sp. das sementes e de outros tecidos de milho, seriam avirulentos ou hipovirulentos ou virulentos mas em uma fase latente, com os fatores de patogenicidade sendo “imobilizados” por alterações fisiológicas exógenas ou endógenas ou ecológicas.

SCHULZ *et al.* (1993), verificaram a eficácia dos métodos de esterilização da superfície dos tecidos das plantas. Dentre vários métodos, o tratamento com etanol 96% por trinta segundos, hipoclorito de sódio 3,8% por cinco minutos, etanol 96% por trinta segundos e lavagens em água esterilizada, bastante semelhante ao utilizado no presente trabalho, foi considerado eficaz para o isolamento de fungos endofíticos.

SCHULZ *et al.* (1993), isolaram como fungos endofíticos, das doze plantas analisadas, gêneros de fungos considerados como parasitas e como saprófagos. Além disso, dos quatorze gêneros encontrados, incluía-se o gênero *Fusarium*. Segundo esses autores, o isolamento de um largo número de gêneros potencialmente patogênicos para as plantas, daria suporte à hipótese de que os endófitos são patógenos latentes. Isso não excluindo a possibilidade dos endófitos viverem comensalmente ou mutualisticamente com seus hospedeiros em algum estágio dos seus ciclos de vida.

Em relação a outras características que poderiam reforçar a condição endofítica das linhagens de *F. moniliforme* obtidas, após esterilização da superfície das sementes de milho assintomático, SOUZA & AZEVEDO (1995) e SOUZA (1996), utilizando, dentre outros fungos endofíticos, a linhagem endofítica 38 (tabela 4.6) de *F. moniliforme* isolada neste trabalho, verificaram que não houve produção de compostos tóxicos pelos fungos endofíticos capazes de afetar ou inibir o crescimento de bactérias endofíticas de milho selecionadas ao acaso e ensaiadas *in vitro*. SOUZA (1996) considerou que esses resultados endossam a possível ocorrência destes microrganismos como endófitos simultâneos de plantas de milho. Esse autor ainda destaca que seriam de grande valia investigações abordando o referido tema, atinente à especificidade e estabelecimento desse fenômeno; funções regulatórias dos microrganismos endofíticos na planta; e sobre o controle das interações microrganismos-planta durante a fase endofítica (não patogênica).

Quanto a esse aspecto, RODRIGUES (1996) estudou o efeito de uma linhagem endofítica isolada no presente trabalho (linhagem 38¹, tabela 4.6), que corresponde à mesma utilizada no trabalho de SOUZA (1996), na capacidade fotossintética de milho. A caracterização das plantas quanto ao potencial fotossintético foi feita por meio da comparação de vários parâmetros fisiológicos e metabólicos, entre plantas axênicas e inoculadas com o endofítico, submetidas a diferentes intensidades de luz. Essa pesquisadora observou que existem diferenças na capacidade fotossintética, em função do aumento da intensidade de luz, entre plantas axênicas e inoculadas, sendo que as primeiras apresentaram uma maior taxa fotossintética. Também foi observado que a taxa de respiração das plantas inoculadas foi maior do que no material controle e axênico. Esses resultados condizem com o observado por MAYER (1989) de que a fotossíntese de plantas infectadas é freqüentemente reduzida pela infecção de fungos, possivelmente causada pela interferência nos sistemas de transporte de elétrons. Ao mesmo tempo, a respiração, ou a assimilação de oxigênio, geralmente aumentariam.

RODRIGUES (1996), sugeriu que o menor conteúdo de carboidratos totais presentes nas plantas inoculadas, pode estar associado ao elevado consumo dos mesmos (carboidratos) no processo respiratório e, conseqüentemente, diminuição da taxa fotossintética nessas plantas. A autora ainda acrescenta que as alterações no processo de fotossíntese e/ou respiração das plantas inoculadas poderiam ser provocadas pelo metabolismo do próprio fungo, que poderia estar absorvendo produtos fotoassimilados e produzindo toxinas. Contudo, os efeitos negativos observados nas plantas inoculadas poderiam estar

¹ Embora a autora não cite a identificação da linhagem, foi exatamente a linhagem 38 que lhe foi cedida para a realização de seus experimentos.

associadas à fase de desenvolvimento da planta. Dessa forma, com o crescimento da planta, os efeitos do fungo poderiam ser revertidos.

Um outro aspecto relevante apresentado por RODRIGUES (1996), foi o de que as plantas inoculadas pelo fungo endofítico resistiram bem ao processo de inoculação e evidenciaram ainda o caráter assintomático dessas infecções, o que ratificaria a condição endofítica desse isolado.

Os fungos isolados segundo o item 3.2, foram identificados com o auxílio da Profa.. Dra. Elza A. Luna A. de Lima da Universidade Federal de Pernambuco. Os isolados do gênero *Fusarium* foram classificados como *F. moniliforme*. A classificação dos isolados de *F. moniliforme* foi confirmada como *F. moniliforme* w. Gams pela Profa. Debora Maria Massa Lima, também do Departamento de Micologia da U.F.Pe. Do total de 54 isolados de *F. moniliforme* de sementes de milho, 12 isolados do local 1(Areão) e 9 isolados do local 2 (Caterpillar) foram utilizados nos experimentos de RAPD, a identificação dos mesmos está sumarizada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Isolados de *F. moniliforme* de sementes de milho de diferentes genótipos, coletadas de dois locais diferentes, com seus referidos códigos utilizados nos experimentos de RAPD.

Código RAPD	Isolado	Linhagens de milho	Local de coleta
L1	2	06-06-3A	Areão
L2	6	06-06-3A	Areão
L3	9	06-08-1A	Areão
L4	16	06-08-1A	Areão
L5	21	06-03-5B	Areão
L6	24	06-03-5B	Areão
L7	25	05-17-1A	Areão
L8	29	05-17-1A	Areão
L9	31	05-17-1A	Areão
L10	35	05-01-4B	Areão
L11	38	05-01-4B	Areão
L12	39	05-01-4B	Areão
L13	91	06-06-3A	Caterpillar
L14	94	06-08-1A	Caterpillar
L15	95	06-08-1A	Caterpillar
L16	100	05-17-1A	Caterpillar
L17	101	05-17-1A	Caterpillar
L18	103	05-01-4B	Caterpillar
L19	105	05-01-4B	Caterpillar
L20	111	06-03-5B	Caterpillar
L21	117	06-03-5B	Caterpillar

4.2. Análise de variabilidade genética via RAPD

4.2.1. Padronização da técnica e seleção de oligonucleotídeos iniciadores

Segundo WILLIAMS et al. (1993) as principais variáveis a serem ensaiadas, são concentrações altas de DNA e magnésio que podem ocasionar

perda de bandas, enquanto concentrações baixas originam bandas não reproduzíveis.

Assim, inicialmente procedeu-se à otimização da técnica de RAPD para os isolados endofíticos de *F. moniliforme*. Dessa forma, procedeu-se à determinação da melhor concentração de Mg^{++} para a reação de amplificação, sendo que os perfis mantiveram-se inalterados nas concentrações de 3,0, 4,0 e 5,0 mM. A concentração utilizada foi a de 3,0 mM.

Avaliou-se ainda o efeito da concentração de DNA genômico na reação, dentro do espectro de 20-150ng. A concentração adotada foi a de 60ng/reação. O padrão de bandas de RAPD não foi marcadamente afetado por diferenças na concentração do DNA molde na faixa avaliada (Figura 4.5). O mesmo foi observado por BENTLEY *et al* (1994), que analisaram esse efeito em uma faixa de 2,5 a 500ng DNA/reação na fase de otimização da técnica de RAPD para *F. oxysporum* f.sp. *cubense*.

Figura 4.5. Padrão de bandas obtido no ensaio para ajuste da concentração de DNA do isolado L3 com o oligo OPX07. As concentrações utilizadas foram (em ng): 2) 30; 3) 60; 4) 90; 5) 120 e 6) 150. 1) marcador de peso molecular (DNA λ clivado com Hind III).

A reação de amplificação foi feita para um volume final de 25 μ l. A concentração e os componentes utilizados na reação estão listados na tabela 4.7. Foram avaliados cerca de 20 oligonucleotídeos de sequência aleatória da Operon Technologies (Kit X), sendo que desses, 10 foram utilizados para a análise de amplificação do DNA (PCR). A sequência e conteúdo de bases CG dos oligonucleotídeos estão na tabela 4.8.

Tabela 4.7. Componentes da reação de amplificação do DNA de *F. moniliforme*.

Componentes	Estoque comercial	Estoque do laboratório	Volume na reação (μl)	Concentração final na reação
Água MilliQ autoclavada	-	-	9,7	qsp.
Tampão	Pharmacia 10X	Pharmacia 10X	2,5	1X
dNTP	Pharmacia 20 mM	2,5 mM	2,0	200μM
Oligonucleotídeos	Operon Technologies cerca de 14μg, liofilizado	4,0 μM	2,5	400 nM
Mg ⁺⁺	Sigma MgCl ₂	7,5 mM	5,0	1,5 ⁽¹⁾
Taq. Polimerase	CENBIOTEC 5.000 U/ml	CENBIOTEC 5.000 U/ml	0,3	1,5 U
DNA molde	-	20 ng/μl ⁽²⁾	3	60 ng

(1) A concentração final na reação de íons Mg⁺⁺ foi de 3,0 mM (parte fornecida pelo tampão Pharmacia e parte acrescentada a partir da solução de MgCl₂ 7,5 mM).

(2) A concentração dos DNAs das diferentes linhagens de *F. moniliforme*, em estoque, variaram de 89 a 1627 ng/μl. Diluições foram realizadas para 20 ng/μl (sub-estoque).

Tabela 4.8 Seqüência de nucleotídios (5'→3') e conteúdo de bases CG dos sete oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' → 3'	P.M.	Conteúdo CG %
OPX 01	CTGGCACGA	3044	70
OPX 02	TTCCGCCACC	2915	70
OPX 06	ACGCCAGAGG	3053	70
OPX 07	GAGCGAGGCT	3084	70
OPX 09	GGTCTGGTTG	3081	60
OPX 12	TCGCCAGCCA	2964	70
OPX 14	ACAGGTCCTG	3059	60
OPX 15	CAGACAAGCC	2997	70
OPX 17	GACACGGACC	3013	70
OPX 18	GACTAGGTGG	3099	60

4.2.2. Polimorfismo por RAPD

Vinte e uma linhagens de *F. moniliforme*, isoladas de duas populações de milho (Tabela 4.6) foram usadas nos estudos de variabilidade genética avaliada por marcadores moleculares (RAPD).

Os 10 oligonucleotídeos utilizados produziram um total de 168 bandas (tabela 4.9), ocorrendo uma média de 17 bandas por oligonucleotídeo. Cerca de 46% dos locos detectados pelo oligonucleotídeo OPX7 mostraram polimorfismos de bandas. Os demais oligonucleotídeos OPX1, OPX2, OPX6, OPX9, OPX12, OPX14, OPX15, OPX17 e OPX18 apresentaram cerca 25, 73;

59, 42; 52; 78, 83, 53 e 63% de marcadores polimórficos, respectivamente. A maioria dos marcadores utilizados na análise de RAPD (isto é, as bandas que puderam ser visualizadas claramente nas fotos dos géis de agarose) variaram de 1,15 a 3,82 Kb em média. A figura 4.6 apresenta o perfil eletroforético obtido com o oligonucleotídeo OPX7.

Em todos os experimentos de amplificação realizados no decorrer deste trabalho, para cada oligonucleotídeo ensaiado, realizou-se uma reação controle contendo todos os componentes da reação de amplificação exceto o DNA molde (branco). Na grande maioria dos ensaios não houve qualquer amplificação no branco, tendo ocorrido contudo amplificações em muito poucas reações controle. Nestes casos, as bandas produzidas no branco eram de número bastante reduzido e não correspondiam às bandas produzidas nas reações com os DNAs molde. Um resultado semelhante também foi observado por BENTLEY *et al* (1994). Esse autores encontraram com frequência um padrão de bandas nesses controles negativos. Esses padrões de bandas eram diferentes daqueles produzidos pela amplificação de qualquer DNA de fungo (*Fusarium* sp.) e foram chamados de “Artefatos Independentes do Molde” (“TIAs”). Nenhuma contaminação havia sido detectada em qualquer dos componentes da reação e o padrão de bandas do branco não foi reproduzível quando realizadas outras amplificações com os mesmos componentes da reação.

Tabela 4.9. Número total de locos detectados e de locos polimórficos gerados pelos oligonucleotídeos, nos 21 isolados de *F. moniliforme* .

Oligonucleotídeos	Nº de locos	
	Total	Polimórficos
OPX1	8	2
OPX2	15	11
OPX6	22	13
OPX7	22	10
OPX9	12	5
OPX12	21	11
OPX14	23	18
OPX15	18	15
OPX17	19	10
OPX18	8	5
TOTAL	168	100

Figura 4.6. Padrões de RAPDs obtidos com o oligonucleotídeo OPX7 usando os DNAs de 21 linhagens de *Fusarium* como molde. 1. marcador de peso molecular λ Hind III; 2. marcador de peso molecular “ladder”; 3 a 23: L1 a L21, respectivamente; 24. marcador de peso molecular “ladder”.

A análise dos perfis de RAPD de todos os oligonucleotídeos em conjunto permitiu a construção da matriz de similaridade (Figura 4.7) segundo o coeficiente de Jaccard. O método de UPGMA gerou o fenograma apresentado na figura 4.8. A análise fenética subdividiu os isolados de *F. moniliforme* em dois grupos principais com cerca de 77% de similaridade entre eles. Cada um desses grupos engloba as linhagens isoladas de sementes coletadas de um local diferente. O grupo um é constituído por linhagens isoladas da Fazenda Areão enquanto o segundo grupo é formado por linhagens isoladas da Caterpillar. Foi possível portanto associar os padrões de RAPD dos isolados endofíticos de *F. moniliforme* ao local de isolamento.

Figura 4.8. Fenograma gerado a partir da metodologia “UPGMA algoritmo” para agrupar os 21 isolados de *F. moniliforme*. Os valores indicados acima referem-se aos coeficientes de similaridade e à direita, os códigos dos isolados de *Fusarium*.

O primeiro grupo é subdividido em dois sub-grupos ao nível de cerca de 78% de similaridade. O primeiro sub-grupo, ao nível de 81% de similaridade é subdividido em outros dois grupos, cada um deles contendo linhagens isoladas de sementes de uma população de milho: o primeiro deles é formado por todos os isolados da população BR106 do local 1 e o segundo é constituído por parte dos isolados da população BR105. A outra parte desses isolados está agrupada no segundo grupo, ao nível 78% de similaridade. Pode-se, dessa forma, associar o agrupamento gerado por RAPD à origem genotípica da linhagem hospedeira (população BR106 ou BR105). Exceto pelos isolados L9 e

L10, todos os demais isolados do local 1 estão sub-agrupados segundo a linhagem das sementes hospedeiras, havendo portanto para o local 1, uma certa associação dos isolados por linhagens de sementes e população de milho, constituindo-se, portanto, em uma associação ao nível intra (linhagens de milho) e interpopulacional (populações de milho BR106 e BR105).

Para o local 2, houve um subagrupamento das linhagens (por hospedeiro) porém, bastante discreta. Somente os isolados L20, L21 e L16 , L17 foram subagrupados, ao nível de 91 e 93% de similaridade respectivamente, de acordo com os genótipos das sementes hospedeiras.

A separação de isolados de *F. moniliforme* em grupos discretos relacionados aos hospedeiros também foi observada por AMOAH *et al.* (1995) por meio de RAPDs. Esses autores sugeriram, baseados nos marcadores RAPD, uma sub-estruturação de uma população de *F. moniliforme* de milho em subgrupos tecido-relacionados (sementes e talo).

AMOAH *et al* (1996) com o objetivo de investigarem o fato por eles destacado no trabalho anterior (AMOAH *et al.*, 1995) de que os isolados de milho de sementes e talo podem ser distinguidos por análises de RAPD, analisaram um grande número de isolados recuperados de sementes e caule de milho. Embora as análises de RAPD não tenham mostrado um agrupamento discreto de isolados em relação à origem (tecido), ocorreu uma tendência na formação de grupos nos quais isolados recuperados de um mesmo tipo de tecido pareceram ser mais fortemente relacionados.

AMOAHA *et al.* (1996), consideram que ainda não existe uma explicação inequívoca da variação dentro do grupo A de *F. moniliforme* (isolados de milho) no que parece ser um grupo relacionado à semente e um grupo relacionado ao caule. Os resultados dos estudos reportados pelos autores dão evidência de variação dentro desse grupo, mostrando a tendência dos isolados obtidos do mesmo tipo de tecido agruparem juntos, indicando um forte relacionamento entre eles.

A análise da variabilidade dos isolados endofíticos de *F. moniliforme*, via RAPD, mostra uma taxa de polimorfismo no genoma dessa espécie em torno de 60%. Essa taxa reforça o conceito de que existe uma alta variabilidade genética natural em *F. moniliforme*. STRICKBERGER (1996) considera que, na maioria das espécies, cerca de 67 a 75% de todos os locos são polimórficos. Onde esse polimorfismo genético daria condições a muitas populações a confrontarem novos desafios ambientais com uma grande variedade de mutações, algumas das quais tendo vantagens preadaptativas. CORREL (1991), comentando sobre a existência de no mínimo 10 loci *vic* controlando a compatibilidade vegetativa em *F. moniliforme*, considerou que, teóricamente, $1.024 (2^{10})$ grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) poderiam existir em uma população dessa espécie, considerando-se que somente dois alelos ocorram em cada locos *vic*. Essa variabilidade genética no gênero *Fusarium* tem sido corroborada por outros pesquisadores.

GRAJAL-MARTÍN *et al.* (1993), analisaram a ocorrência de variabilidade genética entre quatro raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi* por RAPD. Os padrões de bandas gerados pela raça 2 por 14 oligonucleotídeos foi uniforme em relação aos padrões gerados pelas raças 1, 5, e 6. Os isolados das

raças 1, 5 e 6 apresentaram uma variabilidade muito maior do que a apresentada pelos isolados da raça 2. Os autores detectaram um grande nível de variabilidade genética entre e dentro das raças de *F. oxysporum pisi*.. Os autores consideraram que as similaridades e diferenças nos padrões de bandas obtidos por RAPD poderiam ser uma ferramenta molecular útil em estudos evolucionários sobre as origens de diferentes raças. Dentro desse contexto, MIGHELI & CAVALLARIN (1994), reportaram o uso de RAPDs para a determinação de “*formae specialis*”, raça e linhagens em *F. oxysporum* patogênico e antagonista.

ASSIGBETSE *et al.* (1994), utilizaram marcadores RAPD e testes de patogenicidade para avaliarem a diversidade genética entre 46 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* originários de várias partes do mundo. Baseados nos testes de patogenicidade em quatro cultivares de algodão e espécies, os isolados foram diferenciados em três raças (A, 3 e 4), restritas à áreas geográficas definidas. A quantidade de variação genética foi avaliada por PCR com um conjunto de 11 oligonucleotídeos decâmeros randômicos. Todas as amplificações revelaram polimorfismos entre os isolados, e um total de 83 bandas foram consideradas para os 11 oligonucleotídeos testados. Os isolados foram agrupados em três grupos correspondentes às suas reações patológicas.

OUELLET & SEIFERT (1993) observaram uma pequena diversidade genética em linhagens pertencentes ao gênero *Fusarium*. Esses autores caracterizaram linhagens de *Fusarium graminearum* usando RAPD e análises de restrição de fragmentos gerados por PCR. A maioria dos oligonucleotídeos do RAPD ou PCR produziram um ou dois padrões comuns, mas as linhagens puderam ser identificadas pelo perfil combinado desses padrões.

A análise de RAPD mostra que os isolados de *F. moniliforme* apresentam alta variabilidade genética. Aparentemente, existe uma associação entre essa variabilidade e o local de isolamento das linhagens. Os padrões de RAPD também propiciaram uma associação dos isolados ao nível de linhagens de sementes e populacional; sendo que nesses casos a mesma ocorreu de forma parcial. Isso mostra o grande potencial dessa técnica para se estudar as interações fungo-planta ao nível molecular.

Fusarium tem sempre sido considerado um organismo altamente variável. Sendo que deve-se até mesmo dizer que *Fusarium* e variação são sinônimos. (TOUSSOUN, 1981).

4.3. Estudos de transformação genética em *F. moniliforme*.

4.3.1. Obtenção dos mutantes *nia*⁻

Mutantes *nia*⁻ foram obtidos a partir de uma seleção positiva para a resistência ao clorato. Colônias selvagens tem o seu crescimento bastante restringido em meios contendo clorato enquanto que os mutantes que não utilizam o nitrato são resistentes ao clorato, crescendo normalmente. Setores foram obtidos segundo metodologia descrita no item 3.7.16.

Diversos setores vigorosos foram isolados de repiques em placas contendo meio de cultura +1,5% de clorato de potássio. Esses foram ensaiados e classificados segundo o item 3.7.16. Sete mutantes para a utilização do nitrato

foram inicialmente obtidos, sendo que aqueles com mutações no gene estrutural da nitrato redutase (mutantes *nit1*) foram selecionados para os experimentos de transformação com o gene da nitrato redutase de *F. oxysporum* (Tabela 4.10)

Tabela 4.10. Mutantes *nia⁻* obtidos pela seleção positiva para resistência ao clorato.

Designação do mutante	Isolados do local 1 (código RAPD)	Tipo de mutação (item 3.7.16)
S51	L11	<i>nit3</i>
S60	L1	<i>nit1</i>
S61	L1	<i>nit1</i>
S64	L7	<i>nitM</i>
S66	L7	<i>nitM</i>
S67	L7	<i>nitM</i>
S68	L7	<i>nit1</i>

4.3.2. Transformação Genética de *F. moniliforme* com o gene *nia* de *F. oxysporum*

A primeira etapa para a transformação genética foi a otimização da técnica. Foi ensaiado o tempo de lise e a temperatura de crescimento na eficiência de protoplastização, tendo-se verificado que o tempo de lise ideal foi a 2h30min à 26°C, sob agitação de 150 rpm.

Verificou-se ainda que parece haver a influência da quantidade do inóculo inicial na obtenção de protoplastos (Tabela 4.11.).

LANGIN et al (1990), visando aumentar a eficiência de transformação genética do *F. oxysporum* baseado na complementação de linhagens *nia⁻* pelo gene da nitrato redutase de *Aspergillus nidulans*, também

avaliaram alguns parâmetros, tais como a origem e concentração dos protoplastos e a relação protoplasto/plasmídio.

Tabela 4.11. Influência da quantidade de esporos do inóculo inicial na obtenção de protoplastos

Quantidade de esporos em 10 ml de BDA	Nº de protoplastos ($\times 10^7$)	Eficiência
2×10^7	1,6	1
1×10^8	7,2	4,5
2×10^8	2,8	1,8

Segundo esses resultados, a concentração ideal foi a de 1×10^8 esporos /10 ml BDA.

Quanto à otimização da transformação, ensaiou-se três diferentes linhagens mutantes nia⁻ (S60, S61 e S68), em um experimento de transformação utilizando-se o plasmídio pNH24. Os resultado obtidos estão na tabela 4.12.

Tabela 4.12. Transformação genética com pNH24 utilizando-se 4×10^7 protoplastos de três diferentes linhagens..

Mutante	Nº transf./ μ g DNA	Eficiência
S60	4	1
S61	7,24	1.81
S68	16,2	4,05

Esse experimento, em conjunto com outros ensaios envolvendo pelo menos dois desses mutantes, mostrou que a linhagem S68 apresenta uma melhor resposta à transformação genética.

Foi ensaiada ainda a influência da quantidade de protoplastos na eficiência de transformação. Em um experimento em que foram transformados mutantes de dois isolados distintos (S61 e S68), com o plasmídeo pNH24, com duas quantidades de protoplastos (2×10^7 e 4×10^7), observou-se uma melhor condição para a transformação com 4×10^7 (tabela 4.13).

Tabela 4.13. N° de transformantes obtidos com pNH24 em um experimento em que ensaiou-se duas concentrações diferentes de protoplastos.

Mutantes		Concentração de Protoplastos	
		2×10^7	4×10^7
S61	N°	118	160
	T		
	r		
	a		
	n		
S68	s	120	295
	f.		

Observou-se ainda, mantidos os melhores parâmetros já determinados anteriormente, a relação da quantidade de plasmídios e protoplastos. Tendo sido verificado uma melhor eficiência de transformação quando da utilização de 5µg de plasmídeo (tabela 4.14). Segundo LANGIN *et al* (1990), os dois principais fatores biológicos que afetam a eficiência de transformação constituem a concentração de DNA plasmidial (vetor) e a concentração de protoplastos. Eles determinaram como melhor condição para a transformação

genética de *F. oxysporum*, um tratamento de 2×10^7 protoplastos com 5 µg de plasmídio.

Tabela 4.14. N° de transformantes obtidos com a linhagem S68 em um experimento em que ensaiou-se duas concentrações diferentes de plasmídios.

Conc. Plasmídio	N° de transformantes/ µg de DNA
10 µg	30
5 µg	48

Em vista desses resultados, determinou-se como a melhor condição para a protoplastização: um inóculo inicial de 1×10^8 esporos crescidos a 26°C com uma agitação de 150 rpm durante cerca de 17h; a transformação foi feita colocando-se 5µg de DNA em 4×10^7 protoplastos. O melhor mutante para o experimento foi o S68.

Em todos os experimentos de transformação realizados, usou-se como controle um plasmídio sem o gene da nitrato redutase (pUC), ensaiando-se dessa forma a estabilidade das linhagens mutantes utilizadas. Não foram observadas colônias em meio de seleção (MM +estabilizador) na condição controle.

Em um outro experimento de transformação genética usando-se o plasmídio pnH24 confirmou-se a linhagem S68 como o melhor recipiente para a introdução de um vetor-DNA (Tabela 4.15). Diferenças nas eficiências de transformação entre mutantes *nia⁻* de uma mesma espécie de fungo também foram

observadas por FURLANETO & PEBERDY (1993), que verificaram frequências de 4 e 200 transformantes por μg de DNA em experimentos envolvendo o gene *niaD* com dois mutantes para a nitrato redutase de *Aspergillus alliaceus*. HYNES (1986) considera que as taxas de transformação são frequentemente dependentes do vetor e da linhagem utilizados.

Tabela 4.15. N° de transformantes obtidos em um experimento utilizando-se duas linhagens diferentes.

Linhagens	N° de transformantes / μg de DNA
S61	32
S68	59

A transformação do mutante para a nitrato redutase com o plasmídeo que contém o gene da nitrato redutase de *F. oxysporum*, teve uma eficiência de transformação que variou de cerca de 30 a 60 transformantes por μg de DNA, valor este bem superior ao observado na literatura (1 a 2 transformantes), quando utilizou-se o gene da nitrato redutase de *Aspergillus niger* (SÀNCHEZ-FERNÁNDEZ *et al*, 1991).

A menor eficiência de transformação obtida por SÀNCHEZ-FERNÁNDEZ *et al* (1991), pode ser devida à origem do gene heterólogo utilizado (*A. niger*) e ao estabilizador osmótico (KCl). LANGIN *et al* (1990) verificaram, em ensaios de transformação genética em *F. oxysporum*, que a frequência de regeneração dos protoplastos haviam aumentado 2-3 vezes quando utilizou-se MgSO_4 , ao invés de KCl, como estabilizador osmótico. O gene

heterólogo utilizado no presente trabalho, diferentemente do utilizado por SÀNCHEZ-FERNÁNDEZ *et al* (1991), é originário de *F. oxysporum*, fungo pertencente ao mesmo gênero de *F. moniliforme*. A provável maior similaridade dos genes para a nitrato redutase desses fungos em relação ao gene de *A. niger* deve ter tido uma relação direta com a quantidade de transformantes obtidos que expressaram esse gene corretamente. DIOLEZ *et al* (1993), obtiveram um aumento expressivo no número de transformantes *nia*⁺ quando empregaram um gene homólogo de *F. oxysporum* na transformação genética de mutantes *nia*⁻. No entanto, isso não pode ser considerado como uma regra geral.

PANACCIONE *et al.* (1988), utilizando tanto um sistema de transformação genética homóloga (gene da β -tubulina), quanto heteróloga (*tub-2* de *N. crassa*), não lograram eficiências de transformação superiores a 13 transformantes/ μ g de DNA em *C. graminicola*. COOLEY *et al* (1990), efetuando a transformação genética de *Septoria nodorum* com o gene homólogo de resistência ao benomil obtiveram uma eficiência de transformação de apenas 5 transformantes/ μ g de DNA.

Outros resultados semelhantes ao observado por SÀNCHEZ-FERNÁNDEZ *et al* (1991), tem sido observados. RODRIGUES & YODER (1987), transformando o fungo *G. cingulata* com os genes *amdS* de *A. nidulans* e o gene *hygB* de *E. coli*, conseguiram uma eficiência de transformação extremamente baixa de 0,2 transformantes/ μ g DNA.

KELLY *et al* (1994b), na transformação heteróloga de um mutante *Z. arboricola* para a nitrato redutase com o gene *niaD* de *Cephalosporium acremonium*, obtiveram uma frequência de transformação que

variou de 0,3 a 8 transformantes por μg de DNA, com uma frequência média de 3 transformantes/ μg DNA. Semelhantemente, MALARDIER *et al.* (1989), conseguiram frequências de transformação de até 10 transformantes/ μg DNA em *F. oxysporum* utilizando o gene da nitrato redutase de *A. nidulans*. Enquanto que DABOUSSI *et al.* (1991), utilizando o gene regulatório *nirA* de *A. nidulans*, não conseguiram mais do que 1 transformante/ μg DNA.

Portanto, embora a eficiência de transformação genética de *F. moniliforme* com o gene da nitrato redutase de *F. oxysporum*, obtida nesta tese, não tenha sido superior a 100 transformantes/ μg DNA, pode-se considerar que a mesma foi bastante satisfatória, já que se trata de uma transformação heteróloga, onde as eficiências normalmente são bastante reduzidas.

4.3.2.1. Análise molecular dos transformantes

A linhagem mutante S61 e dez transformantes com o plasmídio pNE24 foram selecionados para a análise molecular, objetivando-se verificar a integração do plasmídio no genoma dos mesmos.

O DNA total genômico (5-10 μg de DNA) foi digerido com EcoRI, que corta o plasmídio em dois pontos. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em um gel de agarose a 0,8%, transferidos para membranas Hybond N e hibridizados (item.3.7.25) com o plasmídio pNH24 linearizado com EcoRI (Figura 4.9) e pUC (Figura 4.10), ambos marcados com ^{32}P . Os experimentos de hibridização foram realizados a 65°C. O plasmídio pNH24 foi utilizado como sonda ao invés do plasmídio pNE24, por apresentar

somente a sequência responsável pelo gene além do pUC, enquanto o pNE24 também apresenta duas regiões flangeadoras constituídas por DNA genômico de *F. oxysporum*. Foi possível dessa forma, verificar somente a integração do gene sem a necessidade de uma prévia purificação do mesmo para ser utilizado como sonda.

A análise conjunta dos padrões de hibridização com as sondas pNH24/EcoRI e pUC, revelou que uma banda de cerca de 4,5Kb presente em todos os transformantes, inclusive na linhagem S61, deve corresponder ao gene da nitrato redutase de *F. moniliforme*, possuindo portanto uma homologia ao gene de *F. oxysporum* (*nia*). O padrão de hibridização do transformante T.N.1 mostrou, dentre outras bandas, uma banda de 2,7 Kb que corresponde ao fragmento pUC do plasmídio pNE24 gerado pela clivagem do mesmo com a enzima EcoRI, e uma banda de cerca de 7 Kb que corresponde ao outro fragmento do plasmídio contendo o gene *nia*. Essas duas bandas indicariam uma integração em tandem de várias cópias do plasmídio pNE24. Esse padrão de integração também pode ser observado nos transformantes T.N.6, T.N.8 e T.N.10. Nos transformantes T.N.3, T.N.4 e T.N.5, observou-se que o fragmento de 2,7 Kb correspondente ao inserto pUC do plasmídio pNE24 não está presente, indicando uma integração dentro do pUC. Já o transformante T.N.2 apresenta um padrão de integração em tandem com rearranjo. O transformante TN7 mostrou um padrão de integração em cópia simples.

MALARDIER *et al* (1989), reportaram que transformantes obtidos em transformação mediada por PEG preferencialmente integra diversas cópias do plasmídio. Assim como observado no presente trabalho, padrões de integração em tandem de diversas cópias do plasmídio e sítios múltiplos de

integração também foram observados por MALARDIER *et al* (1989), em experimento envolvendo o gene *niaD* de *A. nidulans* e o fungo *F. oxysporum*. DABOUSSI *et al* (1989), em experimentos de transformação com o gene *niaD* em mutantes *nia* de diversas espécies de fungos, obtiveram padrões de integração em tandem com múltiplas cópias, diferentes sítios de integração e/ou rearranjos internos em cópias integradas. SÀNCHEZ-FERNÀNDES, *et al* (1991), em experimentos de transformação de *Gibberella fujikuroi* com o gene *niaD* de *A. nidulans*, observaram padrões de integração de cópia única e de duas cópias em diferentes sítios de integração. Diferentemente, DIOLEZ *et al* (1993), observaram substituição gênica e recombinação homóloga em transformantes *Nia*⁺ de *F. oxysporum*.

Figura 4.9. Análise molecular dos transformantes de *F. moniliforme* obtidos com pNE24 e hibridizados com o plasmídeo pNH24 linearizado com a EcoRI e marcado com ^{32}P . 1, linhagem recipiente S61; de 2 a 12, transformante T.N.1, T.N.2, T.N.3, T.N.4, T.N.5, T.N.6, T.N.7, T.N.8, T.N.9, T.N.10, plasmídeo pNH24 clivado com EcoRI.

Figura 4.10. Análise molecular dos transformantes de *F. moniliforme* obtidos com pNE24 e hibridizados com o plasmídeo pUC marcado com ^{32}P . 1, linhagem recipiente S61; de 2 a 12, transformante T.N.1, T.N.2, T.N.3, T.N.4, T.N.5, T.N.6, T.N.7, T.N.8, T.N.9, T.N.10, plasmídeo pNH24 clivado com *EcoRI*.

4.3.3. Cotransformação de *F. moniliforme* com os genes *gusA* de *E.coli* e *nia* de *F. oxysporum*

No sistema Gus, foi realizada uma cotransformação com os plasmídios pNH24 e pNOM102. Na primeira seleção, que foi realizada em placas contendo MM, as colônias que se desenvolveram nesse meio foram aquelas que tiveram o gene da nitrato redutase integrado (plasmídio pNH24). Como controle negativo realizou-se uma transformação com pUC; o não aparecimento de colônias no meio seletivo (MM) confirmou a estabilidade do mutante S68. O controle positivo foi realizado utilizando-se o plasmídio pNH24. Para se determinar os transformantes *Nia*⁺ que também tiveram o plasmídio pNOM102 integrado na cotransformação, realizou-se uma avaliação qualitativa segundo o item 3.7.30. As colônias que possuíam atividade Gus emitiram fluorescência sob essa condição (Figura 4.11). Determinou-se assim a porcentagem de cotransformantes obtidos. Desses, 10 foram selecionados para as análises moleculares. A tabela 4.16 sumariza as porcentagens de transformação e cotransformação.

Figura 4.11. Seleção de cotransformantes GUS em transluminador (UV)

A

B

Esquema da placa Elisa indicando a posição dos respectivos transformantes NIA⁺ e linhagens controle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	S68	S68	S68	S68	S68	MT -5

Tabela 4.16. Porcentagens de transformantes e cotransformantes Gus no experimento de cotransformação

Plasmídios utilizados	Percentagens	
	Transformação	Cotransformação
(pNE24 + pNOM102)	75 t/ μ g DNA	57,2%
(pNE24)	37 t/ μ g DNA	0
(pUC)	0	0
(controle)		

COUTEAUDIER *et al* (1993), também utilizaram análises qualitativas para a seleção de transformantes GUS. Semelhantemente ao observado nesta tese, esses autores obtiveram uma frequência de cotransformação superior a 50%.

Em vista desses resultados, procedeu-se à purificação de alguns cotransformantes GUS em MM. A designação dos cotransformantes foi feita baseada na posição dos mesmos na placa Elisa, tendo sido estudados: A3, A4, A9, A11, B4, B7, B9, C2, C3, C8, D7, E10, F1, F2, F3, F5, G4, G12, H1. Colônias purificadas desses cotransformantes foram novamente ensaiadas qualitativamente para a atividade GUS em placa Elisa (Figura 4.12), tendo-se confirmado a expressão do gene *gusA* de *E. coli* nas linhagens A11, B4, D7, F1, F3, G4, G10,

C2, H1, F5, E10, A3, A9, B9, C8, F2, B7. Nessas análises qualitativas utilizou-se como controle negativo a linhagem recipiente S68 e o cotransformante M-T5 obtido por COUTEADIER *et al* (1993), que apresenta uma elevada atividade GUS.

A intensidade de fluorescência dos transformantes GUS, visualizada em placas Elisa com o substrato MUG, mostrou-se ser muito boa comparativamente com a linhagem obtida por COUTEADIER *et al* (1993). Essa intensidade manteve-se mesmo após vários repiques (quando são analisados inóculos de 4-7 dias). O mesmo resultado não foi obtido por BAYLEY *et al.* (1993) com a cotransformação de *Phytophthora* spp. utilizando-se os genes da β -glucuronidase e da resistência à higromicina B. Esses autores ao avaliarem a atividade GUS em zoosporos de *Phytophthora* spp, verificaram que a expressão desse gene ocorria, mas apresentava diferenças quanto à intensidade de coloração para a atividade GUS. Além disso, essa diferença não era eliminada com a transferência de setores (que apresentavam a coloração) para meio seletivo.

4.3.3.1. Análise molecular dos transformantes

Para facilitar a correspondência dos cotransformantes com a visualização nas hibridizações, adotou-se novas denominações para os mesmos a título de discussão. A relação dos códigos aqui empregados (bem como no restante da tese) com as linhagens do estoque estão apresentadas na Tabela 4.17.

A linhagem selvagem 25 (L7 no código do RAPD) e dez cotransformantes com os plasmídios pNE24 e pNOM102 foram selecionados para a análise molecular; objetivando-se verificar a integração do plasmídio no genoma dos mesmos.

O DNA total genômico (5-10 µg de DNA) foi digerido com EcoRI, que cliva os plasmídios em um único ponto. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em um gel de agarose a 0,8%, transferidos para membranas Hybond N e hibridizados com o fragmento de 4,5 Kb HindIII-EcoRI do pNOM102 contendo todo o constructo GUS (Figura 4.13), o plasmídio pNH24 linearizado com EcoRI (Figura 4.14) e pUC marcados com ³²P. Os experimentos de hibridização foram realizados a 65°C.

Tabela 4.17. Linhagens utilizadas, sua designação na tese e seus códigos no estoque:

Código-Tese	Código-Estoque	Característica
TG1	F5	Transformante GUS
TG2	F3	Transformante GUS
TG3	B4	Transformante GUS
TG4	C2	Transformante GUS
TG5	F1	Transformante GUS
TG6	C8	Transformante GUS
TG7	E10	Transformante GUS
TG8	A3	Transformante GUS
TG9	F2	Transformante GUS
TG10	B7	Transformante GUS
TN1	T.61.2	Transformante NIA
TN2	T.61.9	Transformante NIA
TN3	T.61.12	Transformante NIA
TN4	T.61.16	Transformante NIA
TN5	T.61.17	Transformante NIA
TN6	T.61.18	Transformante NIA
TN7	T.61.11	Transformante NIA
TN8	T.61.13	Transformante NIA
TN9	T.61.3	Transformante NIA
TN10	T.61.7	Transformante NIA
COT.E1	202	Transformante Impala
REV.E1	202REV	Revertente Impala
COT.E2	205	Transformante Impala
REV.E2	205REV	Revertente Impala
COT.E3	238	Transformante Impala
REV.E.3.1	238REVA	Revertente Impala
REV.E.3.3	238REVC	Revertente Impala
REV.E.3.4	238REVD	Revertente Impala
REV.E.3.5	238REVE	Revertente Impala
COT.A1	302	Transformante Impala
REV.A1	302REV	Revertente Impala
COT.A2	303	Transformante Impala
REV.A2	303REV	Revertente Impala
COT.A3	309	Transformante Impala
REV.A3	309REV	Revertente Impala
COT.A4	318	Transformante Impala
REV.A4	318REV	Revertente Impala
COT.A5	321	Transformante Impala
REV.A5	321REV	Revertente Impala
COT.A6	324	Transformante Impala
REV.A6	324REV	Revertente Impala

Os padrões de hibridização visualizados na figura 4.13 nos mostram que todos os transformantes possuem seqüências homólogas ao pNOM102. O transformante TG1 apresentou um fragmento que corresponde ao fragmento pNOM102 linearizado, esse padrão pode ser explicado como sendo uma integração de cópias repetidas, não modificadas, em tandem. Os transformantes TG2, TG3, TG4, TG5, TG6 e TG9 apresentam integração múltipla, enquanto o padrão do transformante TG7 constituído por duas bandas, nenhuma das quais sendo do tamanho do plasmídio, indicariam uma integração de uma cópia simples no cromossomo via uma recombinação dentro das seqüências da construção GUS ou a integração de duas cópias simples. O transformante TG10 apresenta um fragmento do mesmo tamanho do plasmídio original mais duas bandas, indicando uma integração de múltiplas cópias do plasmídio em tandem e integrações em outros sítios ou rearranjos. O padrão de hibridização do transformante TG8 deve ser devido a integração simples. O transformante TG5 apresentou integração múltipla e em tandem.

O padrão de hibridização com a sonda do gene da nitrato redutase (figura 4.14), mostra a ocorrência de integrações em diversos sítios. Deve ainda ser destacado o aparecimento de um fragmento de cerca de 5 Kb, presente em todos os transformantes, inclusive na linhagem selvagem 25 (onde não houve hibridização com pUC), que deve corresponder ao gene residente da nitrato redutase de *F. moniliforme*.

Resultados semelhantes foram obtidos por COUATEAUDIER *et al* (1993). O padrão de hibridização dos transformantes GUS com a sonda constituída pelo fragmento de 4.4 Kb, gerado pela clivagem do plasmídio pNOM 102 pelas enzimas HindIII e EcoRI, exhibe integrações do plasmídio em cópia

única; integração em tandem de cópias do plasmídio, não modificadas e repetidas, em um mesmo sítio, com um ou dois fragmentos flanqueadores e integrações em diferentes sítios ou rearranjos.

Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos envolvendo outros sistemas de transformação. DICKMAN & PARTRIDGE (1989), analisaram molecularmente transformantes de *F. moniliforme* com o gene *hygB* e verificaram integrações em diferentes *loci* em alguns transformantes, possivelmente em mais de um sítio. Os autores também observaram integrações em tandem ou inserções em um sítio único com rearranjo das seqüências flanqueadoras cromossomais. Duplicação em tandem e inserção de cópia única também foram observados. RODRIGUES & YODER (1987), observaram integrações de cópias únicas e múltiplas de plasmídios contendo o gene *amdS* e *hygB* no fungo *G. cingulata*.

Figura 4.13. Análise molecular dos cotransformantes de *F. moniliforme* obtidos com pNE24 e pNOM102 hibridizados com o fragmento 4,5 Kb HindIII-EcoRI do pNOM102, contendo toda a construção GUS e marcado com ^{32}P . 1, linhagem selvagem L25; de 2 a 11, cotransformante TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7, TG8, TG9 e TG10.

Figura 4.14. Análise molecular dos cotransformantes de *F. moniliforme* obtidos com pNE24 e pNOM102 hibridizados com o plasmídio pNH24 linearizado com a enzima EcoRI e marcado com ^{32}P . 1, linhagem selvagem L25; de 2 a 11, cotransformantes TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7, TG8, TG9 e TG10.

4.3.3.2. Localização Histoquímica da atividade da β -glucuronidase nas raízes de milho infectadas com o transformante TG3.

As hifas coradas com o X-Gluc (segundo o item 3.7.33) da linhagem transformada, foram claramente visíveis nos tecidos da raiz de milho. A observação do precipitado azul nos micélios de *F. moniliforme* na raiz de milho foi realizada com sucesso (Figuras 4.15 e 4.16), indicando estar o transformante expressando o gene normalmente na planta, com alta atividade gênica, mostrando dessa forma o grande potencial da utilização de fungos endofíticos como “vetores vivos” para a transformação de plantas.

A produção do precipitado azul se dá, segundo WILSON *et al* (1995), em duas etapas: A primeira etapa sendo a hidrólise do substrato (X-Gluc) pela enzima GUS (produto do gene *gusA* de *E. coli*) e a segunda etapa sendo a dimerização oxidativa do indoxyl sem cor que é liberado após a clivagem do substrato pelo GUS.

A visualização do precipitado azul indica a atividade da enzima GUS no micélio. O nível de produção da enzima, mais do que um indicador da biomassa, qualifica-se como uma expressão da atividade do fungo (GREEN & JENSEN, 1995). De acordo com fato, EPARVIER & ALABOUVETTE (1994) consideraram que um gene constitutivamente expressando GUS em *F. oxysporum* f.sp. *lini*, reflete a atividade metabólica da linhagem. Como a atividade GUS naturalmente presente em fungos e plantas é desprezível (JEFFERSON, 1988; LILJEROTH *et al.*, 1993), este sistema torna-se extremamente útil quando se deseja investigar a possibilidade da utilização futura de uma linhagem como

portadora de um gene agronomicamente importante para a transformação de plantas.

O exame direto da localização do fungo por técnica histoquímica permitirá que se realizem estudos de competição, colonização de várias partes da planta pelo endófito, relação fungo-planta, bem como relação do fungo com outros componentes da comunidade de microrganismos que venham a ser albergados pela planta.

GREEN & JENSEN (1995), em um experimento semelhante, promovendo a localização histoquímica da atividade GUS no micélio de transformantes de *Trichoderma harzianum* em raízes de pepino, observaram uma variação de quase nenhuma hifa corada em todos os sistemas da planta a até muitas colônias pequenas de micélio espalhadas randômicamente em diferentes regiões das raízes. Diferentemente do observado no presente trabalho, esses autores verificaram que as hifas estavam restritas a uma ou a poucas células vizinhas, associadas principalmente a diminutas lesões nas raízes.

O exame das raízes de milho por meio da técnica histoquímica não evidenciou a presença de hifas nos tecidos vasculares da planta. Resultado semelhante foi obtido por GREEN & JENSEN (1995) com *T. harzianum* em raízes de pepino.

Quando se realiza ensaios envolvendo fungos transgênicos em plantas, uma questão a ser melhor investigada seria a de que o genoma do fungo permanece intacto ou não após passagem pela planta. Se existem modificações, a que nível elas ocorrem. LESLIE & DICKMAN (1991), baseados em experimentos realizados com transformantes de *Gibberella fujikuroi*, cujo anamorfo é o *F.*

moniliforme, inoculados em milho, apresentaram uma hipótese em que a passagem pela planta de alguma maneira altera o genoma do *F. moniliforme*. O que, segundo esses autores, estaria de acordo com a conclusão de DICKMAN & PARTRIDGE (1989) de que a pressão ambiental exercida nos transformantes pela passagem no milho alterou a estabilidade e a configuração insercional do DNA exógeno no genoma dos fungos isolados. LESLIE & DICKMAN (1991) também destacam o fato de que o *F. moniliforme* parece reconhecer seqüências do DNA exógeno que tenham sido introduzidas em seu genoma. Ocorrendo uma certa modificação dos mesmos: mutações de ponto, inativação e ativação de genes durante o processo meiótico. Embora eles reforcem o fato de que o exato mecanismo pelo qual o *F. moniliforme* manipula o DNA exógeno esteja longe de ser claro, é contudo semelhante com processos que ocorrem em *Neurospora* e *Ascoberhus*.

Assim sendo, ainda segundo LESLIE & DICKMAN (1991), tanto a estabilidade mitótica quanto a meiótica precisam ser consideradas para maximizar o completo potencial biotecnológico e para minimizar qualquer possível risco associado com a liberação no campo e possível movimento de DNA exógeno no ambiente. Ambas as expressões fenotípica e presença genotípica do DNA exógeno devem ser monitorados, desde que é possível que linhagens carregem intactas, mas inativadas, seqüências que podem ser ativadas tardiamente.

Figura 4.15. Localização histoquímica da atividade GUS no micélio do transformante GUS^+ (TG3) nas raízes de 10 dias. O precipitado azul indica a localização da atividade da enzima GUS no micélio. A) aumento de 400X; B) visualização em maior aumento (1000X) do campo anterior, mostrando em maior detalhe os micélios do transformante com o precipitado azul; C) e D) outras regiões da raiz apresentando micélios com o precipitado azul (ambas em aumento de 1000X).

Figura 4.16. Localização histoquímica da atividade GUS no micélio do transformante GUS⁺ (TG3) nas raízes de 10 dias. O precipitado azul indica a localização da atividade da enzima GUS no micélio. A a C) Aumento de 1000X. Essas raízes foram previamente clarificadas com hipoclorito de sódio 2,5%.

4.3.4. Estudo da transposição genética do elemento *Impala* de *F. oxysporum* em *F. moniliforme*.

4.3.4.1. Experimentos de cotransformação de *F. moniliforme* com o elemento *Impala* e uma fonte de transposase.

Objetivando-se verificar se o elemento transponível chamado *Impala*, isolado por LANGIN *et al* (1995) é capaz de transpor em uma diferente espécie, foram realizadas duas cotransformações diferentes. Em cada uma dessas cotransformações usou-se o plasmídio contendo o gene *niaD* de *Aspergillus* de 2,7 Kb interrompido pelo elemento *Impala*-160 de 1.3 Kb (LANGIN *et al*, 1995), dando um gene *niaD* de 4Kb (plasmídio pIIΔNdeI::Imp) e também um plasmídio contendo o ORF da transposase A ou E² e um marcador higromicina (plasmídios pIAH2 e pIEH2, respectivamente). A primeira seleção dos transformantes resistentes à higromicina foi realizada em MM contendo estabilizador osmótico e higromicina B na concentração final de 60,6 µg/ml suplementado com uma fonte de nitrogênio [glutamina (figura 4.17)]. Colônias resistentes à higromicina foram facilmente identificadas após 5 a 7 dias de incubação. Protoplastos transformados com o vetor pUC e semeados no mesmo meio seletivo foram usados como controle negativo. O controle da estabilidade da linhagem receptora (mutante S68) foi realizado semeando-se protoplastos transformados com pUC em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. A mesma preparação de protoplastos foi usada nos experimentos de transformação com *Impala* e

² O ORF das transposases A e E pertencem a diferentes famílias de *Impala* (FML A e FML E, respectivamente, HUA-VAN, A (comunicação pessoal)

transformação com pUC (controle) com o objetivo de se reduzir variabilidade devida à preparações diferentes de protoplastos. As colônias que apresentaram um maior crescimento no primeiro meio seletivo foram transferidas para meio BDA contendo higromicina B na concentração final de 18,2 µg/ml para confirmação. A linhagem receptora, semeada no centro da placa, foi utilizada como fonte de comparação ao crescimento dos transformantes (figura 4.18). Devendo-se considerar que a mesma tem seu crescimento bastante reduzido (mas não completamente inibido) em meio contendo higromicina nessa concentração, enquanto os transformantes não.

Figura 4.17. Semeadura dos protoplastos cotransformados (Impala-Hygro). Observam-se algumas colônias com crescimento mais vigoroso (setas), correspondentes aos transformantes Hygro, e o crescimento residual dos protoplastos que não tiveram o plasmídeo contendo a resistência à higromicina integrado (não transformantes ou transformantes abortivos).

Figura 4.18. Transformantes Hygro e mutante em placa BDA + Higromicina (18,2 $\mu\text{g/ml}$)

As transformações com os plasmídios pIAH2 e pIEH2 resultaram em mais de 100 transformantes por μg de DNA (Tabela 4.18). Esse sistema em que se usou um marcador de seleção dominante para resistência à higromicina, apresentou uma elevada eficiência, tornando-se dessa forma uma poderosa ferramenta em futuros programas de clonagem gênica em *F. moniliforme*. Essa eficiência foi bem superior à obtida por LESLIE & DICKMAN (1991), que conseguiram um número de transformantes de 1 a 2 transformantes/ μg DNA em *F. moniliforme* com o gene *hyg*⁺ de *E.coli*. KISTLER & BENNY (1988), em experimentos de transformação genética em *F. oxysporum* com o gene da resistência à higromicina também não lograram um número de transformantes superior a 1/ μg DNA. No entanto, os números obtidos no presente trabalho são dez vezes inferiores aos obtidos por CROWHURST *et al* (1992), com *Fusarium solani*.

Para a seleção dos cotransformantes que continham o plasmídio pII Δ NdeI::Imp, realizou-se uma hibridização *in situ* das colônias com o gene niaD de *Aspergillus* (item 3.7.26). As colônias que apresentaram sinal positivo continham o plasmídio em questão. As percentagens de cotransformação estão descritas na tabela 4.18. A figura 4.19 mostra o resultado de quatro hibridizações *in situ* de transformantes higromicina com o gene niaD.

Figura 4.19. Hibridizações *in situ* de transformantes higromicina com o gene **niaD**.

Tabela 4.18. Número de transformantes e percentagem de cotransformação obtidos em experimentos de cotransformação no sistema *Impala*.

	PIEH2	pIAH2
Nº de transformantes /µg DNA	100,44	145,4
% Cotransformação	25%	64%

Todos os transformantes ensaiados foram estáveis quando transferidos de um meio não seletivo (MM + glutamina ou BDA suplementado com extrato de levedura e caseína hidrolisada) para um meio contendo higromicina em uma concentração final de 60µg/ml.

4.3.4.2. Seleção dos revertentes *nia*⁺

Alguns cotransformantes *Impala* com um ou outro tipo de plasmídeo que contém o ORF da transposase (A ou E), cotransformantes A ou E, foram ensaiados para a obtenção de revertentes. Revertentes *niaD* selvagens ocorrem devido à restauração da função do gene *niaD* pela excisão do elemento *Impala* inserido nesse gene.

Em torno de 40% de cotransformantes A e 12% de cotransformantes E deram setores com micélio aéreo de rápido crescimento. Alguns desses setores foram purificados e analisados molecularmente com o objetivo de se confirmar se eram revertentes verdadeiros, isto é, se tiveram o elemento *Impala* excisado. Com esse propósito, os “Southern blottings” foram

hibridizados com o gene *niaD* de *A. nidulans* (Figuras 4.20. e 4.21). Como pode-se observar, o padrão de hibridização esperado para revertentes verdadeiros, i.e., a presença da banda de 2,7Kb correspondente ao gene *niaD* não interrompido (*Impala* excisado), foi obtido. Isso em oposição ao padrão dos cotransformantes que apresentaram a banda de 4Kb correspondente à completa construção de *niaD::Impala*.

Figura 4.20. Análise molecular dos cotransformantes e revertentes de *F. moniliforme*. O DNA genômico (5-10µg) foi digerido com EcoR1 e os fragmentos resultantes separados em eletroforese de gel de agarose 0,8%.. O DNA foi transferido para membrana de nylon e hibridizado com o gene *niaD* de *Aspergillus nidullans* marcado com ^{32}P . Canaletas: 1, cotransformante COT.A1; 2, revertente REV.A1 (que foi obtido do COT.A1); 3, COT.A2; 4, REV.A2; 5, COT.A3; 6, REV.A3; 7, COT.A4; 8, REV.A4; 9, COT.A5; 10, REV.A5; 11, COT.A6; 12, REV.A6.

Figura 4.21. Análise molecular dos cotransformantes e revertentes de *F. moniliforme*. O DNA genômico (5-10µg) foi digerido com EcoR1 e os fragmentos resultantes separados em eletroforese de gel de agarose 0,8%. O DNA foi transferido para membrana de nylon e hibridizado com o gene *niaD* de *Aspergillus nidullans* marcado com ^{32}P . Canaletas: 1, cotransformante COT.E2; 2, revertente REV.E2 (que foi obtido do COT.E2); 3, COT.E3; 4, REV.E3.1; 5, REV.E3.3; 6, REV.E3.4; 7, REV.E3.5.

4.3.4.2.1. Análise dos revertentes via PCR.

Objetivando-se confirmar a excisão do transposon nos revertentes, também realizou-se um PCR nos mesmos. O DNA dos revertentes, verdadeiramente obtidos pela excisão do elemento transponível, quando amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos C1 (CCAGTTCATGCCGTGGTCGCTGCGAATTC) e C145 (TTTGCTGAA GAACGAGCTAGAC), que correspondem ao extremos 5' e 3' do gene *niaD*, respectivamente, origina um fragmento de 2,7 Kb (referente ao gene *niaD* não interrompido), em contraposição a uma ausência do mesmo nos revertentes que tenham sido obtidos por qualquer outra razão (como reversão da mutação original da linhagem receptora): em vista do fato de que a sequência *niaD::Impala* de 4Kb ser muito grande para ser amplificada com sucesso. A figura 4.22 mostra o resultado do PCR nos revertentes. Como pode ser observado, em todos os revertentes foi encontrado o fragmento de 2,7Kb confirmando que os mesmos resultaram de um evento de transposição do elemento *Impala*.

Figura 4.22. Perfil eletroforético do PCR dos revertentes utilizando-se os oligonucleotídeos C1 e C145. Canaletas: 1, REV.A1; 2, REV.A2; 3, REV.A3; 4, REV.A4; 5, REV.A5; 6, REV.A6; 7, REV.E1; 8, marcador de peso molecularLadder; 9, REV.E2; 10, REV.E3.1; 11, E3.3; 12, REV.E3.5.

4.3.4.3. Análise dos eventos de reinserção do elemento *Impala*.

Objetivando-se verificar se o elemento *Impala* é capaz de reinserir-se em um outro “background” genômico, o que é importante quando da utilização desse como um sistema de clonagem gênica (“gene tagging”), um conjunto de análises foi feito envolvendo hibridizações com diferentes tipos de sondas: *Impala-160* (Figuras 4.23. e 4.24), regiões flanqueadoras (não apresentado) e *niaD* (Figuras 4.20. e 4.21).

Figura 4.23. Análise molecular dos cotransformantes e revertentes de *F. moniliforme*. O DNA genômico (5-10 μ g) foi digerido com Eco R1 e os fragmentos resultantes separados em gel de agarose 0,8%. O DNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridizada com o elemento *Impala*-160 marcado com 32 P. Canaletas: 1, cotransformante COT.A1; 2, revertente REV.A1 (que foi obtido do COT.A1); 3, COT.A2; 4, REV.A2; 5, COT.A3; 6, REV.A3; 7, COT.A4; 8, REV.A4; 9, COT.A5; 10, REV.A5; 11, COT.A6; 12, REV.A6. Os fragmentos contendo *Impalas*-160 reinseridos estão indicados por setas.

Figura 4.24. Análise molecular dos cotransformantes e revertentes de *F. moniliforme*. O DNA genômico (5-10 μ g) foi digerido com Eco R1 e os fragmentos resultantes separados em gel de agarose 0,8%. O DNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridizada com o elemento *Impala*-160 marcado com 32 P. Canaletas: 1, cotransformante COT.E2; 2, revertente REV.E2 (que foi obtido do COT.E2); 3, COT.E3; 4, REV.E3.1; 5, REV.E3.3; 6, REV.E3.4; 7, REV.E3.5. Os fragmentos contendo *Impalas*-160 reinseridos estão indicados por setas.

Como já mencionado, a capacidade do transposon excisar-se e reinserir-se em um outro sítio no genoma é de grande importância como uma poderosa ferramenta para a clonagem gênica. A identificação de genes usando o elemento *Impala* é possível de ser realizado em vista do fato de que é factível a detecção do inserto *Impala* em um sítio diferente usando-se uma sequência específica *Impala*. Como pode ser observado na figura 4.23, quando comparamos o cotransformante COTA5 e seu revertente REVA5. Os dois são claramente diferenciados por uma nova banda correspondente ao inserto *Impala* do revertente em um sítio diferente, enquanto todas as outras bandas são iguais. Já o padrão de hibridização do revertente REVA2 mostra duas novas do inserto *Impala*, que pode ser explicado por dois eventos independentes de excisão-reintegração, cada um relacionado a diferentes cópias do vetor pIIANdel::Imp que deve ter sido integrado no transformante COTA2 em múltiplas cópias. O padrão de hibridização do REVE2 não mostra qualquer reinserto *Impala*, podendo ser explicado por uma provável perda dele em um evento de reintegração ou uma integração em um sítio não açambarcado na membrana.

Os elementos transponíveis devem ter um papel na evolução relacionado à sua capacidade de invadir novas populações, promovendo então um mecanismo de dispersão de sequências para novos sítios a possuindo um papel na transferência horizontal gênica (DABOUSSI & LANGIN, 1994). A questão referente ao fato de os elementos de *Fusarium* serem capazes de transferências entre espécies, permanece. Nada é sabido sobre ocorrência de transferência horizontal nesses importantes organismos (DABOUSSI & LANGIN, 1994), mas os resultados aqui apresentados, com o estudo do comportamento de cópias do elemento *Impala* introduzidas em um novo “background” genético, mostra que essa hipótese tem uma alta possibilidade de ser verdadeira.

Embora possa ser verificado que o transposon *Impala* pode ser capaz de transpor em *F. moniliforme*, não se pode afirmar que a mobilidade da cópia do *Impala* tenha sido causada pela fonte de transposase (A ou E) do plasmídeo ou por ela mesma (essa cópia pode ser não trans-defectiva como previamente descrita por LANGIN et al, 1995). Se a última hipótese é verdadeira, provavelmente sua habilidade de transposição é sítio-regulada na linhagem original (*F. oxysporum*) e em um diferente ambiente genômico, sem essa pressão regulatória, ele possa saltar.

Em experimentos com fungos, onde por meio da introdução de um DNA exógeno, objetive-se a utilização desses microrganismo no biocontrole e no melhoramento de plantas; os estudos do destino e herança desse DNA torna-se relevante. Trabalhos como o de MURRAY *et al* (1992) que tiveram sucesso na transformação de uma planta com um fungo engenheirado geneticamente indica que no futuro próximo a utilização desses organismos em programas agrícolas como vetores de genes de importância, deverá ser altamente profícua.

Contudo, o estudo dos eventos da transposição genética do elemento *Impala* de *F. oxysporum* em *F. moniliforme*, nos alerta da possibilidade da transferência horizontal de genes entre linhagens ou espécies de fungos diferentes e, do impacto ambiental que poderia advir se isso ocorresse. Ainda mais se for levado em consideração a existência de verdadeiras comunidades de microrganismos endofíticos nas plantas.

5. CONCLUSÕES

Fungos endofíticos são encontrados em sementes de milho, sendo que a espécie de maior frequência é *Fusarium moniliforme*.

Existe uma variabilidade genética entre os isolados endofíticos de *F. moniliforme* analisados por RAPD. Esses isolados puderam ser agrupados por local de isolamento. Também foi observada uma relação entre os isolados, as linhagens e a população de milho ensaiada. Essa relação ocorreu de forma parcial, tendo sido mais evidente nos isolados de um local do que no outro.

O desenvolvimento de uma metodologia de transformação genética, com a realização de diferentes sistemas de transformação, foi realizado com sucesso. Foram obtidas frequências de transformação que variaram de 30 a 145 transformantes/ μ g DNA, sendo alcançada uma eficiência suficiente até para a realização de experimentos de clonagem gênica.

Linhagens marcadas com o gene da enzima GUS expressaram o mesmo . A observação da expressão do gene em questão em um transformante no interior da raiz de milho, revela o grande potencial desse

marcador para estudos de competição, colonização, e dinâmica populacional dos endofíticos na planta, com um monitoramento dos mesmos “in loco”.

A eficiência do sistema GUS, com a localização histoquímica da atividade da beta-glucuronidase nas raízes de milho, reforça o potencial da utilização de fungos endofíticos como portadores de genes para a transformação genética de plantas.

O transposon *Impala* de *Fusarium oxysporum* é capaz de transpor em *F. moniliforme*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOAH, B.K.; REZANOOR, H.N.; NICHOLSON, P. and MACDONALD, M.V. Variation in the *Fusarium* section Liseola: pathogenicity and genetic studies of isolates of *Fusarium moniliforme* Sheldon from different hosts in Ghana. **Plant Pathology**, v. 44, p. 563-572, 1995.
- AMOAH, B.K.; MACDONALD, M.V.; REZANOOR, N. and NICHOLSON, P. The use of the random amplified polymorphic DNA technique to identify mating groups in the *Fusarium* section Liseola. **Plant Pathology**, v.45, p.115-125, 1996.
- ANAYA, N. & RONCERO, M.I.G. *skippy*, a retrotransposon from the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Molecular and General Genetics**, v. 249, p. 637-647, 1995.
- ARAÚJO, W.L. & AZEVEDO, J.L. Diversidade genética em bactérias endofíticas de citros, detectada por marcadores de RAPD. Genetic diversity of endophytic bacteria from citros, detected by RAPD marks. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n.3, p. 311, 1996. Suplemento. Resumo.

- ASSIGBETSE, K.B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M.P.; and GEIGER, J.P.
Differentiation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology**, v.84,p.622-626, 1994.
- AZEVEDO, J.L. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v. 26, p. 55-61, 1975.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v. 2, p. 3-15, 1976.
- AZEVEDO, J.L. Técnicas utilizadas nos processos biotecnológicos envolvendo fungos. IN: CONGRESSO SBSP, 9, São Paulo, 1995. **Anais**. São Paulo. P. 77-87.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo, Ed. Nacional, EDUSP, 1973. 288p.
- AZEVEDO, J.L. & ROPER, J.A. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. **Genetical Research**, v. 16, p. 79-93, 1970.
- BACON, C.W., PORTER, JK., ROBBINS,J.D., and LUTTRELL,E.S.
Epichloe typhina from toxic tall fescue grasses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, p. 576-581, 1977.

- BAYLEY, A.M.; MENA, G.L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transformation of four *Phytophthora* spp by microprojectile bombardment on intact mycelia. **Current Genetics**, v.23, p.42-46, 1993.
- BENTLEY, S.; PEGG, K.G. and DALE, J.L. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyse genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **J. Phytopathology**, v. 142, p.64-78, 1994.
- BENTLEY, S.; PEGG, K.G. and DALE, J.L. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological Research**, v. 99, p. 1378-1384, 1995.
- BERNIER, L.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. and CLARKSON, J.M. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 60, p. 261-266, 1989.
- BIDOCHKA, M.J.; McDONALD, M.A.; ST. LEGER, R.J. & ROBERTS, D.W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, v. 25, p. 107-113, 1994.
- BRAITHWAITE, K.S. & MANNERS, J.M. Human hypervariable minisatellite probes detect DNA polymorphisms in the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Current Genetics**, v.16, p. 473-476, 1989.

- BREEN, J.P. Temperature and seasonal effects on expression of *Acremonium* endophyte-enhanced resistance to *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v. 21, p. 68-74, 1992.
- CAMBARERI, E.B.; HELBER, J.; KINSEY, J.A. *Tad1-1*, an active LINE-like element of *Neurospora crassa*. **Molecular and General Genetics**, v.242, p. 658-665, 1994.
- CAMPBELL, E.I.; UNKLES, S.E.; MACRO, J.A.; HONDEL, V.C.; CONTRERAS, R. Improved transformation efficiency of *Aspergillus niger* using the homologous *niaD* gene for nitrate reductase. **Current Genetics**, v. 16, p. 53-56, 1989.
- CHAPELA, I.H. Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: a comparative study. **New Phytologist**, v. 113, p. 65-75, 1989.
- CHAPELA, I.H. & BODDY, L. Fungal colonization of attached beech branches I. Early stages of development of fungal communities. **New Phytologist**, v. 110, p. 39-45, 1988.
- CLAY, K. Grass endophytes. In: FOKKEMA, N. J. & HEUVEL, J. van den., ed. **Microbiology of phyllosphere**. London, Cambridge University Press, 1986. p. 188-204.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v. 69, p. 10-16, 1988.

- COOKE, D.E.L.; KENNEDY, D.M.; GUY, D.C.; RUSSELL, J.; UNKLES, S.E. AND DUNCAN, J.M. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. **Mycological Research**, v.100, p. 297-303, 1996.
- COOLEY, R.N.; FRANKLIN, F.C.; CATEN, C.E. Cotransformation in the phytopathogenic fungus *Septoria nodorum*. **Mycological Research**, v.94, p.241-246, 1990.
- CORRELL, J.C. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.81, p. 1061-1064, 1991.
- CORRELL, J.C.; KLITTICH, C.J.R.; AND LESLIE, J.F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, v. 77, p. 1640-1646, 1987.
- CORREL, J.C.; PUHALLA, J.E. AND SCHNEIDER, R.W. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. **Phytopathology**, v. 76, p. 396-400, 1986.
- COUTEAUDIER, Y.; DABOUSSI, M.J.; EPARVIER, A; LANGIN, T.; and ORCIVAL, J. The GUS gene fusion system (*Escherichia coli* β -D-Glucuronidase gene), a useful tool in studies of root colonization by *Fusarium oxysporum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1767-1773, 1993.

CROWHURST, R.N.; REES-GEORGE, J.; RIKKERINK, E.H.A.; and TEMPLETON, M.D. High efficiency transformation of *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* race 2 (mating population V). **Current Genetics**, v. 21, p. 463-469, 1992.

DABOUSSI, M.J.; DJEBALLI, A.; GERLINGER, C.; BLAISEAU, P.L.; BOUVIER, I.; CASSAN, M.; LEBRUN, M.H.; PARISOT, D.; BRYGOO, Y. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v. 15, p.453-456, 1989.

DABOUSSI, M.J. & LANGIN, T. Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Genetica**, V. 93, p. 49-59, 1994.

DABOUSSI, M.J., LANGIN, T. & BRYGOO, Y. Fot 1, a new family of fungal transposable elements. **Molecular and General Genetics**, v. 232, p.12-16, 1992.

DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T.; DESCHAMPS, F.; BRYGOO, Y.; SCAZZOCCHIO, C.; and BURGER, G. Heterologous expression of the *Aspergillus nidulans* regulatory gene *nir A* in *Fusarium oxysporum*. **Gene**, v. 109, p.155-160, 1991.

DAVIN-REGLI, A.; ABED, Y.; CHARREL, R.N.; BOLLET, C. and MICCO, P. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. **Res. Microbiol.**, v. 146, p. 561-568, 1995.

DAVIS,M.J. & AUGUSTIN,B.J. Occurrence in Florida of the bacterium that causes bermudagrass stunting disease. **Plant Disease**, v. 68, p.1095-1097, 1984.

DAVIS,M.J., GILLASPIE JR,A.G., VIDIVAR,A.K., HARRIS,R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 34, p.107-117, 1984.

DICKMAN, M.B. & PARTRIDGE, J.E. Use of molecular markers for monitoring fungi involved in stalk rot of corn. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 535-539, 1989.

DIOLEZ, A.; LANGIN,T.; GERLINDER, C.; BRYGOO, Y. and DABOUSSI, M.J. The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. **Gene**, v. 131, p. 61-67, 1993.

DOUDRICK, R.L.; RAFFLE, V.L.; NELSON, C.D. and FURNIER, G.R. Genetic analysis of homokaryons from a basidiome of *Laccaria bicolor* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Mycological Research**, v. 99, p. 1361-1366, 1995.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of Soil Fungi**, Academic Press, v.1, 1980, 859 p.

- EGGER, K.N. & FORTIN, J.A. Identification of taxa of E-strain mycorrhizal fungi by restriction fragment analysis. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p. 1482-1488, 1989.
- EPARVIER, A.; and ALABOUVETTE, C. Competition between pathogenic and non pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. **Biocontrol Sci. Technol.**, v.4, p.35-47, 1994.
- ESPINOSA-GARCIA, F.J. & LANGENHEIM, J.H. The endophytic fungal community in leaves of coastal redwood population - diversity and spatial patterns. **New Phytologist**, v. 116, p. 89-97, 1990.
- FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In BIOLOGICALLY ACTIVE NATURAL PRODUCTS. POTENCIAL USE IN AGRICULTURE. **Symposium 380** (H.G. Cutler, Ed.), American Chemical Society, Washington, 1988. p.120-128.
- FANNIN, F.F., BUSH, L.P., SIEGEL, M.R., ROWAN, D.D. Analysis of peramine in fungal endophyte - infected grasses by reversed-phase thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 503, p.288-292, 1990.
- FERNANDEZ, D.; ASSIGBETSE, K.; DUBOIS, M.P.; and GEIGER, J.P. Molecular characterization of races and vegetative compatibility groups in *fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4039-4046, 1994.

FERNÁNDEZ, F.A. & HANLIN, R.T. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. **Mycologia**, v.88, p. 425-440, 1996.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1985, 219p.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions British Mycological Society**, v. 86, p. 153-93, 1986.

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

FLETCHER, L.R., & HARVEY, I.C. An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. **New Zealand Veterin. Journal**, v. 29, p. 185-186, 1981.

FUNGARO, M.H.P., VIEIRA, M.L.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, V. 22, P. 389-392, 1996.

FURLANETO, M.C. and PEBERDY, J. Transformation of *aspergillus alliaceus* using the *aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 110, p. 163-166, 1993.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1993. 631p.

GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kieli detectada por RAPD. Curitiba, 1995, 115p. Dissertação. (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

GLAYZER, D.C.; ROBERTS, I.N.; ARCHER, D.B.; OLIVER, R.P. The isolation of *Ant 1*, a transposable element from *Aspergillus niger*. **Molecular and General Genetics**, v. 249, p. 432-438, 1995.

GOODWIN, P.H., ANNIS, S.L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2482-2486, 1991.

GRAJAL-MARTÍN, M.J.; SIMON, C.J.; and MUEHLBAUER, F.J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. **Phytopathology**, v.83, p. 612-614, 1993.

GREEN, H. and JENSEN, D.F. A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*: II. The use of a GUS transformant for ecological studies in the rhizosphere. **Phytopathology**, v. 85, p. 1436-1440, 1995.

GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R.L.; NODARI, R.; JOHNSON, W.C.; TEMPLE, S.R.; MANDALA, D.; MIKANDAWIRE, A.B.C.; and GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests

coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v.85, p.600-607, 1995.

HALLMANN, J. & SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p. 155-162, 1996.

HAWSWORTH, D.L.; SUTTON, B.C.; AINSWORTH, G.C. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi**. Kew, CMI, 1983.

HERING, O. & NIRENBERG, H.I. Differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato and related species by RAPD PCR. **Mycopathologia**, v. 129, p. 159-164, 1995.

HYNES, M.J. Transformation of filamentous fungi. **Experimental Mycology**, v. 10, p. 1-8, 1986.

JABAJI-HARE, S.H.; MELLER, Y.; CHAREST, P.M. Investigation of genetic relatedness among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* using cloned DNA probes. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.12, p. 393-404, 1990.

JEFFERSON, R.A. Plant reporter genes: The GUS gene fusion system. In: SETLOW, J.K. (Ed.) **Genetic Engineering. Principles and Methods**, v.10. New York: Plenum Press, 1988. p. 247-263.

- JULIEN, J., PIRIER-HAMON, S. and BRYGOO, Y. *Foret1*, a reverse transcriptase-like sequence in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 3933-3937, 1992.
- KACHROO, P.; LEONG, S.A.; CHATTOO, B.B. *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular and General Genetics**, v.245, p. 339-348, 1994.
- KEDERA; C.J., LESLIE, J.F., AND CLAFLIN, L.E. *Fusarium moniliforme* in maize, an endophyte? In: **Fifth International Mycological Congress**.. Vancouver, Canada, 1994. ABSTRACTS. p. 106.
- KELLY, A.; ALCALÁ-JIMÉNEZ, R.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B.; PÉREZ-ARTÉS, E.; and JIMÉNEZ-DÍAZ, M. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* infecting chickpea. **Phytopathology**, v.84, p. 1293-1298, 1994a.
- KELLY, R.; REGISTER, E.; SOSA, M. Heterologous transformation of *Zalerion arboricola*. **Current Genetics**, v.26, p. 217-224, 1994b.
- KERSULYTE, D.; WOODS, J.P.; KEATH, E.J.; GOLDMAN, W.E. & BERG, D.E. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.7075-7079, 1992.

- KHUSH, R.S.; BECKER, E.; AND WACH, M. DNA amplification polymorphisms of cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2971-2977, 1992.
- KINSEY, J.A. & HELBER, J. Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.86, p.1929-1933, 1989.
- KISTLER, H.C. AND BENNY, U.K. Genetic transformation of the fungal plant wilt pathogen, *Fusarium oxysporum*. **Current Genetics**, v. 13, p. 145-149, 1988.
- KLITTICH, C.J.R. AND LESLIE, J.F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, v.118, p.417-423, 1988.
- KOHN, L.M.; PETSCHKE, D.M.; BAILEY, S.R.; NOVAK, L.A.; ANDERSON, J.B. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.78, p. 1047-1051, 1988.
- LAMONDIA, J.A. and ELMER, W.H. Pathogenicity and vegetative compatibility among isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* colonizing asparagus tissues. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 2420-2424, 1989.
- LANFRANCO, L.; WYSS, P. MARZACHI, C. & BONFANTE, P. DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico. **FEMS Microbiological Letters**, v. 114, p. 245-252, 1993.

- LANGIN, T.; CAPY, P.; DABOUSSI, M. J. The transposable element *impala*, a fungal member of the TC1-*mariner* superfamily. **Molecular and General Genetics** v. 246, p.19-28, 1995.
- LANGIN, T., DABOUSSI, M.J., GERLINGER, C, and BRYGOO, Y. Influence of biological parameters and gene transfer technique on transformation of *Fusarium oxysporum*. **Current Genetics**, v. 17, p. 313-319, 1990
- LESLIE, J.F. and DICKMAN, M.B. Fate of DNA encoding hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1423-1429, 1991.
- LESLIE, J.F., PEARSON, C.A.S., NELSON, P.E. & TOUSSON, T.A. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. **Phytopathology**, 80, p. 343-350, 1990.
- LEUCHTMANN, A. & CLAY, K. Isozyme variation in the fungus *Atkinsoniella hypoxylon* within and among populations of its host grasses. **Canadian Journal of Botany**, 67: 2600-2607, 1989.
- LEUNG, H.; LEHTINEN, U.; KARJALAINEN, R.; SKINNER, D.; TOOLEY, P.; LEONG, S.; and ELLNNGBOE, A. Transformation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* to hygromycin B resistance. **Current Genetics**, v. 17, p. 409-411, 1990.

- LIAO, C.H. & CHEN, T.A. Isolation, culture and pathogenicity to sudangrass of a corynebacterium associated with ratoon stunting of sugarcane and with bermudagrass. **Phytopathology**, v. 71, p. 1303-1306, 1981.
- LILJEROTH, E., JANSSON, H.B., and SCHÄFER, W. Transformation of *Bipolaris sorokiniana* with the GUS gene and use for studying fungal colonization of barley roots. **Phytopathology**, v. 83, p. 1484-1489, 1993.
- LIU, D.; van HEESWIJCK, R.; LATCH, G.; LEONFORTE, T.; PANACCIO, M.; LANGFORD, C.; CUNNINGHAM, P.; REED, K. Rapid identification of *Acremonium lolii* and *acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, p. 95-98, 1995.
- LONGO, A.C.; SCHRANK, A & AZEVEDO, J.L. Desenvolvimento de um sistema de transformação genética para *Colletotrichum musae*, com o gene heterólogo de resistência ao benomil. **Brazilian Journal of Genetics**, v.18, n.3, p. 176, 1995. Suplemento. Resumo.
- LOTT, J.T.; KUYKENDALL, R.J.; WELBEL, S.F.; PRAMANIK, A. & LASKER, B.A. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, V. 23, P. 463-467, 1993.
- MALARDIER, L.; DABOUSSI, M.J.; JULIEN, J.; ROUSSEL, F.; SCAZZOCCHIO, C.; and BRYGOO, Y. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. **Gene**, v. 78, p. 147-156, 1989.

MANIATS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor laboratory, 1989. 545p.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; and BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* from carnation. **Phytopathology**, v.84, p. 98-101, 1994.

MAREK, E.T.; SCHARDL, C.L.; and SMITH, D.A. Molecular transformation of *Fusarium solani* with an antibiotic resistance marker having no fungal DNA homology. **Current Genetics**, v. 15, p.421-428, 1989.

MAYER, A. M. Plant-fungal interactions: a plant physiologist's viewpoint. **Phytochemistry**, v.28, p. 311-317, 1989.

McCLINTOCK, B. Chromosome organization and gene expression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 16, p. 13-47, 1951.

McDONALD, J.F. Evolution and consequences of transposable elements. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.3, p. 855-864, 1993.

METZENBERG, R.L. Benefactor's lecture: the impact of molecular biology on mycology. **Mycological Research**, v. 95, p. 9-13, 1991.

MICHELMORE, R.W. & HULBERT, S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p. 383-404, 1987.

- MIGHELI, Q. and CAVALLARIN, L. Characterization of antagonistic and pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates by random amplification of polymorphic DNA. **Molecular Biotechnology**, v. 2, p.197-200, 1994.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURRAY,F.R., LATCH,G.C.M., SCOTT,B.D. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular General Genetics**, v. 233, p. 1-9, 1992.
- NASPOLINI FILHO, V.; GAMA, E.E.G.; VIANNA, R.T.; MÔRO, J.R. General and specific combining ability for yield in a diallel cross among 18 maize populations (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Genética**, v.4, p. 571-7, 1981
- OLIVER, R. Transposons in filamentous fungi. In: STAHL, U. & TUDZYNSKI, P. (Ed) **Molecular biology of filamentous fungi**. Berlin: VCH, 1992, p. 3-11.
- OLIVER, R.P.; FARMAN, M.L.; JONES, J.D.G.; and HAMMOND-KOSACK, K.E. Use of fungal transformants expressing β -glucuronidase activity to detect infection and measure hyphal biomass in infected plant tissues. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 6, p. 521-525, 1993.
- OUELLET, T. & SEIFERT, K. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**, v. 83, p. 1003-1007, 1993.

- PAFFETTI, D.; BARBERIO, C.; CASALONE, E.; CAVALIERI, D.; FANI, R.; FIA, G.; MORI, E.; and POLSINELLI, M. DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism is useful for yeast typing. **Res. Microbiol.**, v. 146, p. 587-594, 1995.
- PANACCIONE, D.G.; McKIERNAN, M.; HANAU, R.M. *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous benomyl resistance genes retains expected pathogenicity to corn. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.1, p. 113-120, 1988.
- PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L. and PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, p. 362-364, 1993.
- PETRINI, O. Wirtsspezifität endophytischer pilze bei einheimischen ericaceae. **Botanica Helvetica**, v. 95, p. 213-238, 1985.
- PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. p. 175-187 in Fokkema, n.j. and van den Heuvel, j. (editors). **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.
- PETRINI, O. & FISCHER, P.J. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stems of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 91, p. 233-238, 1988.

PETRINI, O. & FISHER, P.J. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragillis* and *Quercus robur*. **Mycological Research**, v. 94, p. 1077-1080, 1990.

PETRINI, O., PETRINI, L.E., LAFLAMME, G. and OUELLETTE, G.B. Taxonomic position of *Gremmeniella abietina* and related species: a reappraisal. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 2805-2814, 1989.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.F.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-148, 1953.

PUHALA, J.E. Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. (Ed) **Fusarium: diseases, biology, and taxonomy**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University, 1981. cap. 27, p.291-305.

PUHALLA, J.E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 179-183, 1985.

PUHALLA, J.E & SPIETH, P.T. Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. **Experimental Mycology**, v.7, p. 328-335, 1983.

PUHALLA, J.E & SPIETH, P.T. A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). **Experimental Mycology**, v. 9, p. 39-47, 1985.

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

REITER,S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMANN,K.A., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., SCOLNIK,P.A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 89, p. 1477-1481, 1992.

RODRIGUES, L.S. Efeito de fungos endofíticos no metabolismo fotossintético de plantas de banana (*Musa cavendish*) e milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1996, 102p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

RODRIGUES, R.J. & YODER, O.C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemutianum*). **Gene**, v. 54, p. 73-81, 1987.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, Exeter Publishing, 1988.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL,S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T., MULLIS, K.B.; EHRLICH, H.A. Primer directed enzymatic

amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SALCH, Y.P. & BEREMAND, M. *Gibberella pulicaris* transformants: state of transforming DNA during asexual and sexual growth. **Current Genetics**, v. 23, p. 343-350, 1993.

SÀNCHEZ-FERNÁNDEZ, R.; UNKLES, S.E.; CAMPBELL, E.I.; MACRO, J.A.; CERDÀ-OLMEDO, E. and KINGHORN, J.R. Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase. **Molecular and General Genetics**, v. 225, p. 231-233, 1991.

SCHMID-BERGER, N.; SCHMID, B. and BARTH, G. *Ylt 1*, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 2477-2482, 1994.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; and AUST, H.-J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, v. 97, p. 1447-1450, 1993.

SIDHU, G.S. *Gibberella* spp., pathogens of many crop species. In: INGRAM, D.S. & WILLIAMS, P.H. (Ed.). **Advances in plant pathology**. SIDHU, G.S. (Ed.) **Genetics of plant pathogenic fungi**. Academic Press, 1988. Cap. 9, p. 159-167.

- SIEBER, T.N. Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden und geschädigten Fichten [*Picea abies*(L.) Karsten]. **European Journal of Forest Pathology**, v. 18, p. 321-342, 1988.
- SIEBER, T., RIESEN, T.K., MULLER, E., and FRIED, P.M. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ. =*Septoria nodorum* (Berk.) Berk. **Journal of Phytopathology**, v. 122, p. 289-306, 1988.
- SIEBER, T.N., SIEBER-CANAVESI, F., and DORWORTH, C.E. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 407-411, 1991.
- SIEBER-CANAVESI, F., PETRINI, O., and SIEBER, T.N. Endophytic *Leptostroma* species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea*: a Cultural, Biochemical, and Numerical Study. **Mycologia**, v. 83, p. 89-96, 1991.
- SILVA, A.C.; PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L. Obtenção de fungos endofíticos de milho (*Zea mays*) var. PIRANÃO. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 18, São Paulo, 1992. Resumos. São Paulo: SBG/USP, 1992, p. 134.
- SNEATH, P.H. & SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1973, 573p.
- SOUZA, A.O. Isolamento e Identificação de bactérias endofíticas de milho (*Zea mays* L.) e análise de sua variabilidade genética por RAPD. Piracicaba, 1996,

85 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.

SOUZA, A.O. & AZEVEDO, J.L. Interação de bactérias e fungos endofíticos isolados de milho (*Zea mays* L.). In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20, Piracicaba, S.P., 1995. ANAIS. Piracicaba: SBG/USP/ESALQ, 1995. p. 126.

SOUZA, A.O. & AZEVEDO, J.L. Variabilidade genética em *Bacillus* endofíticos isolados de três populações de milho (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n.3, p. 360, 1996. Suplemento. Resumo.

SOUZA JUNIOR, C.L.; SANTOS, M.X.; MAGNAVACA, R.; GAMA, E.E.G. Estimativas de parâmetros genéticos na interpopulação de milho BR-105 x BR-106 e suas implicações no melhoramento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, p. 473-9, 1993.

STASZ, T.E.; HARMAN, G.E. and WEDEN, N.F. Transformation as a natural mechanism of genetic exchange in *Trichoderma* for production of superior biological control agents. **Phytopathology**, v.78, p. 1549, 1988. (Conference abstract).

STONE, J.K. Foliar endophytes of *Pseudotsuga menziesli* (Mirb.) Franco. Cytology and physiology of the host-endophyte relationship. Eugene, 1986. 124p. (PhD). University of Oregon.

STOVALL, M.E., & CLAY, K. Fungitoxic effects of *Balansia cyperi*. **Mycologia**, v. 83, p. 288-295, 1991.

STRICKBERGER, M.W. **Evolution**. 2.ed. Londres: Jones and Bartlett Publishers, 1996. 669p.

SUMMERBELL, R.C.; CASTLE, A.J.; HORGAN, P.A. and ANDERSON, J.B. Inheritance of restriction fragment length polymorphisms in *Agaricus brunnescens*. **Genetics**, v. 123, p. 293-300, 1989.

TESTER, C.F. Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. **Soil Biol. Biochem.**, v. 24, p. 1107-1112, 1992.

THRANE, C.; LÜBECK, M. GREEN, H.; DEGEFU, Y.; ALLERUP, S.; THRANE, U.; and JENSEN, D.F. A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*: I. Transformation with the GUS gene by protoplast technology. **Phytopathology**, v. 85, p. 1428-1435, 1995.

TOUSSOUN, T.A. Prologue. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. (Ed) **Fusarium: diseases, biology, and taxonomy**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University, 1981. p.289-290.

TURNER, J.T., LAMPEL, J.S., STEARMAN, R.S., SUNDIN, G.W., GUNYUZLU, P., ANDERSON, J.J. Stability of the α -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3522-3528, 1991.

WELSH,J., McCLELLAND,M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p. 7213-7218, 1990.

WEST,C.P.; OOSTERHUIS,P.M.; WULLSCHLEGER,S.D. Osmotic adjustment in tissues of tall fescue in response to water deficit. **Environ. Exp. Bot.**, v. 30, p. 149-156, 1990.

WHITE,T.J.; ARNHEIM,N.; ERLICH,H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 185-189, 1989.

WHITE JR., J.F. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. **Mycologia**, v. 80, p. 442-446, 1988.

WHITE JR., J.F. Endophyte-host associations in grasses. XVII. Ecological and physiological features characterizing *Epichloe typhina* and some anamorphic varieties in England. **Mycologia**, v. 84, p. 431-441, 1992.

WHITE JR., J.F. & COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. V. Ocurrance of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. **Mycologia**, v. 78, p. 846-50, 1986.

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

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; RAFASALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis with RAPD markers. In: Bennett, J.W. & Lasure, L.L. **More Gene Manipulations in Fungi**. New York. 1991. Appendix A. p. 431-439.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v.218, p.704-740, 1993.

WILSON, K.J.; SESSITSCH, A.; CORBO, J.C.; GILLER, K.E.; AKKERMANS, A. D.L. and JEFFERSON, A.R. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. **Microbiology**, v. 141, p. 1691-1705, 1995.

WRIGHT, G.F.K., GUEST, D.I.; WILMALAJEEWA, D.L.S. and van HEESWIJCK, R. Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 451-457, 1996.

VENTER, S.L.; THERON, D.J.; STEYN, P.J.; FERREIRA, D.I.; and EICKER, A. Relationship between vegetative compatibility and pathogenicity of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* from potato. **Phytopathology**, v. 82, p. 858-861, 1992.

YLI-MATTILA, T.; PAAVANEN, S.; HANNUKKALA, A.; PARIKKA, P.; TAHVONEN, R. and KARJALAINEN, R. Isozyme and RAPD-PCR analysis

of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. **Plant Pathology**, v. 45, p. 126-134, 1996.

YUAN, G.F.; LIU, C.S.; AND CHEN, C.C. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2384-2387, 1995.

XU, J.-R. & LESLIE, J. A genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). **Genetics**, v. 143, p. 175-189, 1996.

ZHANG, Y. & MOLINA, F.I. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 17-20, 1995.