**EFEITO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO
DE PLANTAS DE BANANA (*Musa cavendish*)
E MILHO (*Zea mays* L.)**

LUCIANA SANTOS RODRIGUES
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de Concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio de 1996

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

Rodrigues, Luciana Santos

Efeito de fungos endofíticos no metabolismo fotossintético de plantas de banana (*Musa cavendish*) e milho (*Zea mays* L.) / Luciana Santos Rodrigues. - - Piracicaba, 1996.

86p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Banana - Metabolismo fotossintético 2. Fotossíntese 3. Fungo parasito de planta
4. Milho - Metabolismo fotossintético I. Título.

CDD 634.772
633.15

**EFEITO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO
DE PLANTAS DE BANANA (*Musa cavendish*)
E MILHO (*Zea mays* L.)**

Luciana Santos Rodrigues

Aprovada em 05/07/1996

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira

ESALQ/USP
ESALQ/USP
ESALQ/USP

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate
-Orientador-

**Aos meus pais Agostim e Izaura
e aos meus irmãos Gustavo e Juliana**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate pela orientação, pelo apoio e amizade.

À Prof. Dra. Maria Lúcia C. Vieira pelas facilidades concedidas no Laboratório Central de Cultura de Tecidos.

Aos colegas e funcionários do Laboratório Central de Cultura de Tecidos, pelo auxílio prestado na realização deste trabalho, em especial ao amigo Carlos A. de Oliveira.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelas facilidades concedidas durante a execução deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP, em especial ao Zezo, Welington, Chirlei e Luciana, pelas sugestões e auxílio.

Ao José Odair Pereira pelas sugestões e incentivo.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ/USP, em especial ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro.

Às grandes amigas de república Ana Cida, Elaine, Helen, Silvia, Tânia e Marli pela amizade, carinho e incentivo sempre.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial aos técnicos José Carmezini e Marcos Gorga pelo auxílio e amizade.

À Mônica Labate pelo apoio e sugestões.

Às grandes amigas Juliana, Thaís, Vera, Cristiana e Marisa pela amizade, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

À Vera Quecini pelo auxílio prestado na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Ao João A. Pamphile pelo auxílio prestado na realização deste trabalho.

À minha família, em especial à minha avó Izaura, às tias Maria, Nilza e Rose Nelly pelo incentivo e amor.

Ao Rogério de Melo Costa Pinto pelo estímulo e amor.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Considerações Gerais sobre Fungos Endofíticos	03
2.1.1 Conceito	03
2.1.2 Taxonomia e Distribuição dos Fungos Endofíticos no Tecido Hospedeiro	04
2.1.3 Transmissão de Fungos Endofíticos	05
2.2 Patógenos Latentes e Endofíticos	07
2.3 Especificidade com o Hospedeiro	09
2.4 Antagonismo à Herbívoros e Patógenos	11
2.5 Efeito dos Fungos Endofíticos sobre a Biologia do Hospedeiro	12
2.5.1 Efeito de Endofíticos no Desempenho da Planta	12
2.5.2 Efeitos na Morfologia e Fisiologia Geral dos Hospedeiros	15
2.6 Mudanças Metabólicas Induzidas por Infecção Fúngica	17
2.6.1 Metabolismo Fotossintético	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Obtenção das Plantas Hospedeiras	21
3.1.1 <i>Musa cavendish</i>	21
3.1.2 <i>Zea mays</i> L.	22
3.2 Fungos Endofíticos Utilizados	22

3.2.1 Gênero <i>Colletotrichum</i>	23
3.2.2 Gênero <i>Fusarium</i>	23
3.3 Inoculação de Fungos Endofíticos em Plantas Axênicas	24
3.3.1 <i>Musa cavendish</i>	24
3.3.2 <i>Zea mays</i> L.	26
3.4 Sistema de Cultivo das Plantas	26
3.5 Caracterização das Plantas Axênicas e Inoculadas quanto ao	
Potencial Fotossintético	28
3.5.1 Capacidade de Fixação de CO ₂	28
3.5.1.1 <i>Musa cavendish</i>	28
3.5.1.2 <i>Zea mays</i> L.	29
3.5.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	30
3.5.2.1 Análise da Fluorescência da clorofila	35
3.5.2.1.1 <i>Musa cavendish</i>	35
3.5.2.1.2 <i>Zea mays</i> L.	37
3.5.3 Reisolamento de Endofíticos	38
3.5.4 Determinação do Conteúdo de Clorofila Total	39
3.5.4.1 <i>Musa cavendish</i>	39
3.5.4.2 <i>Zea mays</i> L.	40
3.5.5 Preparo do Extrato Foliar	40
3.5.5.1 Extração com Ácido Perclórico	41
3.5.6 Determinação da Feofitina	42
3.5.7 Determinação do Conteúdo de Amido, Sacarose	
e Metabólitos	43
3.5.7.1 Extração do Amido	43
3.5.7.1.1 Análise do Conteúdo de Amido	44
3.5.7.2 Determinação do Conteúdo de Sacarose	44
3.5.7.3 Determinação do Conteúdo de Ácido 3-fosfoglicérico	

(PGA)	44
3.5.7.4 Determinação do Conteúdo de Piruvato (PIR) e fosfoenolpiruvato (PEP)	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Inoculação e Reisolamento de Endofíticos em Plantas de Banana e Milho	46
4.2 Efeito da Presença de Fungos Endofíticos no Metabolismo Fotossintético em Plantas de Banana e Milho	48
4.2.1 Capacidade de Fixação de CO ₂ , Conteúdo de Clorofila Total e ϕ_p^{open}	48
4.2.2 Conteúdo de Amido, Sacarose e de Metabólitos	56
4.2.3 Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	64
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Valores de ϕ_P^{open} (máxima eficiência do PSII) e conteúdo de clorofila total (mg de clorofila.m ⁻²) em plantas de banana. Os dados representam uma média de 10 plantas axênicas e 7 plantas inoculadas com <i>Colletotrichum musae</i> ± desvio padrão.	52
Tabela 2: Valores de ϕ_P^{open} (máxima eficiência do PSII) e conteúdo de clorofila total (mg de clorofila.m ⁻²) em plantas de milho. Os dados representam uma média de 6 plantas controle, 7 plantas axênicas e 7 plantas inoculadas com <i>Fusarium moniliforme</i> ± desvio padrão	53
Tabela 3: Conteúdo de amido, sacarose e carboidratos totais (μmol de hexoses equivalentes. mg ⁻¹ de clorofila) em plantas de milho. Os dados representam uma média de 5 plantas axênicas, 5 plantas controle e 5 plantas inoculadas com <i>Fusarium moniliforme</i> ± o desvio padrão.	56
Tabela 4: Conteúdo de PGA, PIR e PEP (nmol .mg ⁻¹ de clorofila) em plantas de milho. Os dados representam uma média de 5 plantas axênicas, 5 plantas controle e 5 plantas inoculadas com <i>Fusarium moniliforme</i> ± o desvio padrão.	61

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1:** Plantas de banana (*Musa cavendish*) inoculadas com *Colletotrichum musae*. Os frascos com plantas axênicas e inoculadas foram mantidos em câmara de crescimento por 15 dias para adaptação. 25
- Figura 2:** Sistema de cultivo de plantas axênicas e inoculadas em vasos. As condições assépticas foram mantidas durante todo o período de crescimento das plantas. 27
- Figura 3: A-**Câmara de análise da fotossíntese acoplada ao sistema de congelamento rápido de folhas. 31
- Figura 3: B-**Sistema de congelamento rápido associado ao analisador de gás infravermelho (IRGA) e fluorômetro, usados para medida de absorção de CO₂ e fluorescência da clorofila *a*. 32
- Figura 4:** Padrão de resposta do “quenching” da fluorescência da clorofila *a* pelo método dos pulsos saturantes. **A:** luz modulada (frequência 1,6 kHz) para a obtenção de F₀; **B:** pulso de luz saturante (aproximadamente 15000 μmol.m⁻².s⁻¹) para a obtenção de F_M; **C:** luz actínica contínua ligada simultâneamente com o pulso de luz

saturante (a cada 20 segundos). Dependendo das condições de luz, cinco estados diferentes são distinguidos, correspondendo a pontos característicos da produção de fluorescência e coeficientes de “quenching”. *Indicadores de intensidade de fluorescência*- F_0 : fluorescência mínima (intensidade de fluorescência com todos os centros de reação do PSII abertos enquanto a membrana do tilacóide está no estado não energizado, isto é, adaptada no escuro); F_M : fluorescência máxima (intensidade de fluorescência obtida quando todos os centros de reação do PSII estão fechados no estado adaptado no escuro); F_V : fluorescência variável máxima obtida quando todos os processos não fotoquímicos são mínimos ($q_N=0$); F'_M : fluorescência máxima com todos os centros de reação do PSII fechados em qualquer estado adaptado na luz; F_S : fluorescência no estado fixo, isto é, a fluorescência não muda enquanto os fatores externos permanecerem constantes, F'_V : fluorescência variável máxima em qualquer estado adaptado na luz; F'_0 : fluorescência mínima em qualquer estado adaptado na luz.

Parâmetros de fluorescência- q_P : “quenching” fotoquímico e q_N : “quenching” não fotoquímico. 36

Figura 5: A-Reisolamento do fungo endofítico *Colletotrichum musae*, de fragmentos de tecido foliar de banana e, B-Reisolamento do fungo endofítico *Fusarium moniliforme* de fragmentos de tecido foliar de milho, submetidos à esterilização da superfície com hipoclorito de sódio 3%, após análise da fotossíntese. 47

Figura 6: Curva de resposta da taxa de evolução de O_2 em função do aumento na intensidade de luz em plantas de banana axênicas (●) e inoculadas (○) com *Colletotrichum musae*. Os dados representam uma média de 7 plantas axênicas e 5 plantas inoculadas. A taxa de evolução de O_2 foi analisada em condições saturantes de CO_2 (5%), a 25°C. 49

Figura 7: Curva de resposta da fotossíntese em função do aumento na intensidade de luz em plantas de milho axênicas (▼) controle (●) e inoculadas (▽) com *Fusarium moniliforme*. Os dados representam uma média de 6 plantas axênicas, 7 plantas inoculadas e 8 plantas controle. A taxa de fixação de CO_2 foi analisada em condições ambientes de CO_2 , a 25°C. 50

Figura 8: Parâmetros de fluorescência em folhas de milho. A- q_P (“quenching” fotoquímico) e B- q_N (“quenching” não fotoquímico). Os dados representam uma média de 6 plantas axênicas (▼), 8 plantas controle (●) e 7 plantas inoculadas (▽) com *Fusarium moniliforme*. 65

Figura 9: Parâmetros de fluorescência em folhas de milho. A- F'_M/F'_V (eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação do PSII em plantas adaptadas na luz) e B- ϕ_{PSII} (eficiência quântica das reações fotoquímicas). Os dados representam uma média de 6 plantas axênicas (▼), 8

plantas controle (●) e 7 plantas inoculadas (∇) com

Fusarium moniliforme. 67

**EFEITO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO
DE PLANTAS DE BANANA (*Musa cavendish*)
E MILHO (*Zea mays* L.).**

Autora: LUCIANA SANTOS RODRIGUES

Orientador: PROF. DR. CARLOS ALBERTO LABATE

RESUMO:

Fungos endofíticos são aqueles que ocorrem no interior das plantas e causam infecções assintomáticas em tecidos. O trabalho teve por objetivo estudar o efeito de fungos endofíticos no metabolismo fotossintético de plantas de banana (*Musa cavendish*) e milho (*Zea mays* L.). O desempenho fotossintético das plantas axênicas e inoculadas com fungos endofíticos foi avaliado através de parâmetros como fixação de CO₂ e evolução de O₂, fluorescência da clorofila, conteúdo de clorofila total, conteúdo de carboidratos (amido e sacarose) e conteúdo de metabólitos. Os resultados mostraram a existência de diferenças na capacidade fotossintética, em função do aumento da intensidade de luz. As plantas axênicas de ambas espécies apresentaram uma taxa fotossintética maior que as plantas inoculadas. O conteúdo de clorofila total nas plantas axênicas foi superior ao encontrado em plantas inoculadas. Os parâmetros de fluorescência da clorofila mostraram que as plantas inoculadas de banana (ϕ_p^{open}) e de milho estão sofrendo algum tipo de estresse provavelmente devido à presença do fungo. Plantas inoculadas de milho mostraram elevado conteúdo de ácido 3-fosfoglicérico quando comparadas com as plantas axênicas e controle. Os valores de fosfoenolpiruvato e piruvato das plantas axênicas e inoculadas

foram superiores aos das plantas controle. As alterações no conteúdo de metabólitos das plantas inoculadas sugerem mudanças na atividade de enzimas do ciclo C_4 e do ciclo de Calvin, possivelmente devido à alterações no metabolismo da planta induzidas pelo fungo. As plantas inoculadas de milho apresentaram ainda menor conteúdo de carboidratos totais e um aumento na taxa respiratória quando comparadas com as plantas axênicas. Estes resultados sugerem que a presença do fungo pode estar alterando o processo de partição de carbono nas plantas inoculadas e dessa forma diminuindo a capacidade fotossintética nessas plantas. A redução na capacidade fotossintética das plantas inoculadas poderia ainda ser provocada pelo metabolismo do próprio fungo, absorvendo produtos fotoassimilados e produzindo toxinas.

EFFECT OF ENDOPHYTIC FUNGI ON THE PHOTOSYNTHETIC METABOLISM OF BANANA (*Musa cavendish*) AND MAIZE (*Zea mays* L.) PLANTS

Author : LUCIANA SANTOS RODRIGUES

Adviser : PROF. DR. CARLOS ALBERTO LABATE

SUMMARY:

Endophytic fungi occur inside plants causing asymptomatic infections in tissues. The present study focuses on the effect of endophytic fungi on the photosynthetic metabolism of banana (*Musa cavendish*) and maize (*Zea mays* L.) plants. The photosynthetic performance of axenic and endophytic inoculated plants was assessed by determining CO₂ fixation and O₂ evolution, chlorophyll fluorescence, total chlorophyll content, carbohydrate contents (starch and sucrose) and metabolite content. The results showed differences in photosynthetic capacity, with increasing light intensity. Axenic plants of both species display higher photosynthetic rates than inoculated plants. Total chlorophyll content was generally higher in axenic plants than inoculated plants. Fluorescence results indicate that inoculated banana (ϕ_p^{open}) and maize plants are under some form of stress, possibly due to the presence of the fungus. Inoculated maize plants exhibited an elevated level of 3-phosphoglyceric acid compared to the axenic and control plants. Phosphoenolpyruvate and pyruvate values for axenic and inoculated plants were higher than those for control plants. Metabolite contents were also different for the inoculated plants, suggesting changes in the enzymatic activities of the C₄ pathway and Calvin cycle, probably due to alterations in plant metabolism caused by the presence of the fungus.

Inoculated maize plants also had lower total carbohydrate content and higher respiratory rates relative to axenic plants. These combined results suggest that the fungus may be altering carbon partitioning in inoculated plants, decreasing the photosynthetic capacity of the plants. The decrease in photosynthetic capacity for inoculated plants could also be caused by the fungus' metabolic activities, consuming photoassimilates and producing toxins.

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são aqueles isolados do interior de tecidos ou órgãos vegetais aéreos. Tais microrganismos se distribuem colonizando espaços intercelulares em alguma fase, ou em todo o seu ciclo de vida, sem causar sintomas aparentes de doença ou danos relativos à sua presença no hospedeiro. Nesta categoria de microrganismos encontram-se fungos, bactérias e vírus. Nos últimos anos, diversos relatos sobre a presença de fungos endofíticos em vários hospedeiros, sugerem que a sua ocorrência é um fenômeno geral entre as plantas.

A identificação de alterações metabólicas na fotossíntese de plantas inoculadas com fungos endofíticos, através de medidas fisiológicas *in vivo*, é muito importante para o estabelecimento das bases do conhecimento das interações fungo-planta. A compreensão do efeito destes microrganismos na regulação de processos metabólicos das plantas hospedeiras, certamente, levará ao conhecimento de vários aspectos práticos e de interesse para a agricultura.

O estudo desses microrganismos tanto do ponto de vista morfológico, como fisiológico e genético, vem sendo incrementado nos últimos anos e embora já tenham sido encontradas associações entre endófitos e plantas que levam ao melhor desempenho das plantas

infectadas (Latch et al., 1985; White Jr. & Cole, 1985 e 1986; Read & Camp, 1986; Siegel et al., 1987), as interações entre fungos endofíticos e vegetais, na maioria dos casos, constituem-se ainda em uma incógnita.

Dessa forma, para elucidar a base fisiológica das interações que ocorrem entre a planta hospedeira e o microrganismo, o trabalho teve como objetivo estudar o efeito de fungos endofíticos na regulação do processo fotossintético em plantas de banana (*Musa cavendish*) e milho (*Zea mays* L.). A caracterização das plantas quanto ao potencial fotossintético foi feita através da comparação de vários parâmetros fisiológicos e metabólicos, entre plantas axênicas e inoculadas com endofíticos específicos, submetidas a diferentes intensidades de luz. O desempenho fotossintético das plantas foi analisado através de parâmetros como fixação de CO₂, evolução de O₂, fluorescência da clorofila, conteúdo de clorofila total, conteúdo de carboidratos (amido e sacarose) e metabólitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações Gerais sobre Fungos Endofíticos

2.1.1 Conceito

Tradicionalmente, a classificação de microrganismos era feita no sentido de localização do microrganismo no hospedeiro. Desse modo, o microrganismo podia viver sobre ou dentro de seu hospedeiro. Foi Bary (1866)¹, citado por Pereira (1993), que denominou os microrganismos que vivem sobre a superfície de seu hospedeiro de epifíticos, enquanto que aqueles que vivem no interior dos tecidos das plantas foram denominados de endofíticos, em casos de infecção assintomática ou não e no caso de interações simbióticas ou antagonistas.

No entanto, nos últimos anos, o relato da ocorrência assintomática de fungos em plantas, sugerindo que esses microrganismos podem colonizar órgãos internos sem causar sintomas aparentes de doenças, tem dado um novo sentido ao conceito de endofíticos. O termo endofítico vem sendo mais precisamente empregado no sentido de organismos que causam infecções assintomáticas em tecidos aéreos de plantas e, a sua presença no hospedeiro não pode ser detectada por simples inspeção, em virtude da ausência de sintomas.

¹ BARY, A. de Morphologie und physiologie der Pilze. Flechten, und Myxomyceten. Vol. II. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany, Leipzig, 1866.

Carroll (1986) restringiu o uso do termo endofítico para organismos que causam colonizações assintomáticas, em folhas e ramos de plantas saudáveis, sendo encontrado frequentemente no interior das plantas. Com o aumento das investigações na área e com as descobertas de diferentes aspectos da interação dos fungos com os seus hospedeiros, Petrini (1991), propôs que a definição de Carroll (1986), fosse expandida para incluir todos os organismos que, habitando a parte aérea, fossem capazes de colonizar, em algum tempo de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

2.1.2 Taxonomia e Distribuição dos Fungos Endofíticos no Tecido Hospedeiro

A identificação dos fungos endofíticos, segundo Petrini (1986) é extremamente difícil devido à falta de informações relativas ao cultivo de espécies já descritas, bem como pela escassez de informações sobre o microhabitat peculiar dos tecidos vegetais.

Segundo Clay (1990), a taxonomia dos fungos endofíticos é baseada na morfologia de estruturas de frutificação em plantas hospedeiras e no tipo de conídios e ascósporos produzidos. Taxonomicamente os fungos endofíticos de gramíneas são, com poucas exceções, Ascomicetos (Carroll, 1988; Clay, 1990), mas dentro dos Ascomicetos são bastante diversificados, incluindo Loculoascomicetos, Discomicetos e Pirenomicetos (Petrini, 1986). Segundo White Jr. (1988) o estado sexual de muitos fungos não é conhecido, dessa forma eles não podem ser classificados como Ascomicetos (fungos perfeitos ou teleomórficos) e sim como Deuteromicetos (fungos imperfeitos ou anamórficos). Todavia, esses endofíticos são semelhantes à forma

assexual de muitas espécies com estado sexual conhecido. Isso sugere que os endofíticos assexuais como consequência se originaram da fase sexual de alguns fungos. Endofíticos assexuais têm sido agrupados na forma de gênero, o *Acremonium* seção *Albo-lanosa* (White Jr. & Morgan-Jones, 1987). Eles não frutificam em seus hospedeiros e são transmitidos através de sementes de plantas infectadas.

Quanto à distribuição dos fungos endofíticos no interior do tecido hospedeiro, White Jr. et al. (1993), usando técnicas de coloração e microscopia de luz, detectaram a presença de micélio no espaço intercelular de folhas, sementes e talos de *Festuca arundinacea* Schreb. (gramínea). Wilson et al. (1991), demonstraram a presença de hifas endofíticas em folhas e sementes de cinco espécies de *Lolium*. Johnson & Whitney (1989), também verificaram a presença de hifas no espaço intercelular e aderidas na parede externa de células do parênquima, porém nenhuma hifa no espaço intracelular foi observada. Segundo Hinton & Bacon (1985), Arachevaleta et al. (1989), Rice et al. (1990), Lindstron et al. (1993) e Lindstron & Belanger (1994), as hifas endofíticas são mais densas nos espaços intercelulares da região meristemática, no mesófilo das folhas, no cerne da inflorescência e principalmente nos órgãos dreno da planta como bainha e medula que são regiões ricas em sacarose.

2.1.3 Transmissão de Fungos Endofíticos

Infecções latentes causadas por fungos endofíticos já foram relatadas em gramíneas (Bacon et al., 1977; Clay, 1988; Wallner et al., 1983), arbustos (Petrini et al., 1982) e árvores (Carroll & Carroll, 1978;

Katz & Lichth, 1980) além de muitos outros hospedeiros. Estudos recentes indicam que fungos endofíticos infectam pelo menos cerca de 80 gêneros de gramíneas e mais de 100 espécies de plantas, incluindo coníferas e importantes espécies produtoras de grãos (Clay, 1990). Petrini (1991) afirmou que pelo menos 300 espécies de plantas tiveram o registro de fungos assintomáticos em seus tecidos aéreos.

Quanto à forma de dispersão dos fungos endofíticos sabe-se que, endofíticos assexuais não frutificam em seus hospedeiros e são transmitidos através de sementes de plantas infectadas, já endofíticos sexuais produzem corpos de frutificação (estroma) nas folhas e/ou inflorescências de plantas hospedeiras no período que coincide com o florescimento destas. Corpos de frutificação produzem conídios e ascosporos. Com base nesse fato, White Jr. et al. (1993) sugerem a classificação de fungos endofíticos em três categorias, dependendo do grau com que esses formam estroma (região produtora de conídios e ascosporos) na população de gramíneas da subfamília Pooideae. Dessa forma, quando estromas são formados em todos os indivíduos infectados, de modo que a reprodução sexual dessas plantas é completamente suprimida, estes endófitos são considerados patógenos (tipo I) e crescem rapidamente em todos os meios de cultura. Quando estromas são formados em uma fração da população infectada, causando pequena esterilidade na população, de forma que o fungo possa ser transmitido pela semente do hospedeiro, estes endófitos pertencem ao tipo II. Já os fungos endofíticos do tipo III, não formam estroma nas plantas infectadas sendo transmitidos exclusivamente por sementes e crescem vagarosamente em meio de cultura. Segundo White Jr. et al. (1993), não há qualquer evidência de que este tipo de infecção seja detrimental para a planta, e o fungo endofítico, neste caso, não pode ser considerado

patogênico. A formação do estroma parece estar relacionada com a capacidade deste fungo em utilizar o açúcar disponível na planta, no momento da sua formação.

Cabral (1985) verificou que fungos que habitam a superfície externa de folhas podem colonizar o interior de órgãos de plantas, principalmente quando há decréscimo de espécies endofíticas após o início do processo de senescência dos tecidos. Tais fungos, denominados por Petrini (1986), endófitos facultativos, estão relacionados com a decomposição de matéria orgânica e são mais frequentemente isolados de tecidos velhos.

2.2 Patógenos Latentes e Endofíticos

O uso indiscriminado do termo endófito tem causado certa confusão pois, o simples fato de se encontrar em determinados hospedeiros fungos endofíticos com aparente falta de patogenicidade não significa que esteja ocorrendo um caso de simbiose. Segundo Sinclair (1991), muitos fitopatógenos latentes são isolados do interior de tecidos vegetais, mostrando dessa forma a dificuldade em se distinguir estes de endófitos verdadeiros.

Carroll (1988), afirma que na agricultura a distinção entre patógenos latentes e certos endofíticos é confusa pois, os fungos que causam infecções latentes são responsáveis por podridões e perdas de produção pós-colheita e somente irão se manifestar causando lesões, muitos meses após a emergência das folhas. O mesmo autor afirma que, se a transição de patógeno para endófito é fácil, práticas agrícolas modernas podem favorecer determinados fungos endofíticos a se

tornarem possíveis patógenos. Hospedeiros tolerantes a endófitos não teriam qualquer benefício com a associação, em situação de uso intensivo de agroquímicos e o equilíbrio entre fungos e plantas poderia ser rompido, em consequência de seleção natural, favorecendo hospedeiros intolerantes a endófitos. O autor relata ainda que as evidências taxonômicas sobre as relações entre patógenos e endófitos são estreitas e, freqüentemente, os fungos endofíticos são espécies muito próximas a patógenos virulentos. Por exemplo, *Acremonium coenophialum*, um importante fungo endofítico de gramíneas, é muito próximo de *Epichlœ typhina*, um patógeno (Clay, 1988). *Rhabdocline parkeri*, um endófito do “Pinheiro de Douglas” (*Pseudotsuga menziensis*), compartilha muitas similaridades morfológicas com dois patógenos virulentos de folhas, o *R. wierii* e *R. pseudotsugae* (Sherwood-Pike et al., 1986).

Segundo Sinclair (1991), infecção latente pode ser reconhecida como um tipo de tolerância ou resistência a certos patógenos, onde o parasita encontra o ambiente interno impróprio para crescimento e multiplicação, e resulta de um processo de coevolução entre plantas e patógenos. Tal coevolução permitiria o maior acúmulo de resistência e aptidão gênica no hospedeiro e vários parasitas, onde alta suscetibilidade individual de plantas, e alta virulência dos patógenos seriam eliminadas no início do processo evolutivo. As evidências disponíveis sugerem que os fungos endofíticos tenham evoluído diretamente de fungos fitopatogênicos (Carroll, 1988). Segundo Schulz et al. (1993), uma sistemática paralela entre endófitos e parasitas facultativos sugere uma íntima relação evolucionária e/ou fisiológica entre os dois grupos. Neste trabalho com métodos de isolamento de endófitos em 20 plantas herbáceas e arbustos, os gêneros dos fungos encontrados eram anteriormente conhecidos como parasitas ou saprófitas.

Estes resultados suportam a idéia de Carroll (1988) que endófitos podem ser patógenos latentes. Isto não significa que os endófitos não possam viver comensalmente ou mutualisticamente, dentro de seus hospedeiros em algum estágio de seu ciclo de vida. Durante a fase mutualística, o fungo pode absorver substrato necessário para o seu desenvolvimento e proteção física do hospedeiro.

Aparentemente, fungos endofíticos podem tornar-se patogênicos, quando a concentração de inóculo é suficientemente alta ou quando o hospedeiro está sob estresse (Andrews et al., 1985). Segundo Schulz et al. (1993), quando o hospedeiro está doente ou estressado, o equilíbrio mutualístico é perturbado e o endofítico passa a ser um oportunista. Por isso o autor prefere a descrição de estado mutualístico de fungos e plantas como “exploração recíproca”, ao conceito de simbiontes. Algumas vezes a patogenicidade está relacionada com a fase sexual do fungo. Neste caso, Sinclair (1991), propôs o termo endófito clavicipitaceous anamorfo, para o fungo mutualista e endófito clavicipitaceous teleomorfo para o patogênico.

2.3 Especificidade com o Hospedeiro

Devido a aspectos benéficos conferidos pelos fungos endofíticos aos seus hospedeiros, há um considerável interesse dos melhoristas em se conhecer mais sobre os endófitos e ampliar o espectro de hospedeiros dos fungos endofíticos desejáveis. No entanto, é sabido que há compatibilidade limitada entre os vários isolados de fungos endofíticos e as plantas que não sejam seus hospedeiros naturais. A maioria das tentativas de produzir novas interações entre fungos

endofíticos e seus hospedeiros falhou. As interações entre eles que resultam em infecção eficiente são completamente desconhecidas (Lindstron & Belanger, 1994).

Pereira (1993) afirma que, nas famílias de plantas em que os endofíticos foram mais intensamente estudados, as Pinaceae, Cupressaceae, Ericaceae e Gramineae, sempre houve uma associação entre a microflora e um determinado hospedeiro demonstrando uma especificidade na relação fungo-planta. O autor cita ainda os fungos *Colletotrichum* sp. e *Xylaria* sp. como fungos endofíticos mais comuns em hospedeiros tropicais.

Toti et al. (1992) descreveram um mecanismo de aderência entre conídios do endofítico *Discula umbrinella* (Berk & Br.) Morelet, em superfícies de hospedeiros e de não hospedeiros. Hamer et al. (1988), constataram a presença de uma delicada bainha contendo polissacarídeo na superfície do conídio que, aparentemente, está envolvida no processo de aderência. Segundo os autores trata-se de um mecanismo bastante específico. A produção de enzimas extracelulares, responsáveis pela infecção e colonização das plantas, assim como a produção de hormônios pelos fungos endofíticos, indicam que estes sofreram, possivelmente, coevolução com seus hospedeiros e estão bem adaptados aos seus ambientes (Petrini, 1991).

Lindstron & Belanger (1994) isolaram uma proteinase de *Acremonium typhinum* Morgan-Jones & Gams recém descoberta (nomenclatura de Barret, 1986) que é expressa durante a infecção endofítica do capim *Poa ampla* Merr. cv. Service (capim azul alto). Esta proteinase é secretada e está associada à membrana. Outras espécies de *Poa* infectadas endofiticamente também apresentaram atividade de protease semelhante. A expressão de tal protease fúngica, no entanto, não

parece ser uma característica universal da infecção de capins por *Acremonium*, uma vez que não foi detectada atividade semelhante em *Lolium perenne* L. (centeio forrageiro perene) ou em *Festuca arundinacea* Schrub. (capim alto), infectados com estes endofíticos. Isto levantou a possibilidade de que a expressão desta proteinase fúngica possa ser uma característica importante da infecção endofítica das espécies de *Poa*. Os mesmos autores afirmam que a expressão da proteinase, denominada de At1 por ser a primeira proteinase isolada de *Acremonium typhinum*, está relacionada com a diminuição de nutrientes uma vez que sua expressão foi maior em culturas mais velhas. Os autores sugerem ainda, que a expressão da proteinase At1 tem como funções, produzir peptídeos e aminoácidos para o fungo, possibilitando obter todos os nutrientes do apoplasto da planta, funcionar na proteção do fungo endofítico contra proteínas vegetais antifúngicas e redução de barreiras estruturais do hospedeiro à ramificação das hifas no tecido.

2.4 Antagonismo à Herbívoros e Patógenos

Há vários exemplos na literatura, sugerindo que a presença de fungos endofíticos está associada com o aumento de resistência a insetos e herbívoros e alguns onde sua presença promove antagonismo ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos.

Observa-se que muitos insetos discriminam entre plantas infectadas e não infectadas por fungos endofíticos, sugerindo que estes fungos poderiam conferir resistência a herbivoria aos seus hospedeiros, por diminuição da palatabilidade destes devido à produção de toxinas pelo fungo, de forma que os predadores passem a evitá-los. Segundo

Clay (1989), endófitos clavicipitaceos de gramíneas, produzem um número de compostos biologicamente ativos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo provavelmente os responsáveis pelos efeitos nocivos em animais herbívoros. Estes alcalóides produzidos pelos endófitos são geralmente referidos como tendo um papel de defesa pelo fungo protegendo seu hospedeiro. Sementes infectadas por endofíticos também contém uma maior concentração de alcalóides e são provavelmente menos atacadas por vertebrados e invertebrados que se alimentam de sementes (Cheplick et al., 1989). Segundo Carroll (1988), as toxinas produzidas pelos endofíticos podem beneficiar as plantas ao repelirem herbívoros porém, o custo metabólico para a planta pode ser alto pelo desvio de energia para o metabolismo do fungo e, algumas vezes, pode levar à perda da função reprodutiva.

Infecções assintomáticas podem ainda “imunizar” as plantas hospedeiras contra parasitas patogênicos e saprófitas, decrescendo a senescência da planta (Carroll & Carroll, 1978; Carroll, 1988; Matta, 1971). White Jr. & Cole (1985) registraram um possível antagonismo pelo endófito de gramíneas *Acremonium coenophialum* contra diversos patógenos. O filtrado de cultura de *Acremonium coenophialum*, inibe o crescimento *in vitro* dos conhecidos patógenos de gramíneas *Nigrospora sphaerica*, *Periconia sorghina* e *Rizoctonia cerealis*.

2.5 Efeito dos Fungos Endofíticos sobre a Biologia do Hospedeiro

2.5.1 Efeito de Endofíticos no Desempenho da Planta

Gramíneas infectadas por fungos endofíticos do gênero *Acremonium* são semelhantes a plantas não infectadas. Todavia, a

porcentagem de sementes granadas produzidas pelas plantas de *Festuca arundinacea* Schreb. infectadas com fungos endofíticos foi, segundo Clay (1987), duas vezes maior quando comparadas àquelas não infectadas. Uma taxa maior de germinação de sementes foi verificada nas plantas infectadas, bem como maior produção de biomassa. O autor sugere que a concentração de hifas em regiões meristemáticas dos hospedeiros, poderia facilitar a regulação hormonal da divisão celular e diferenciação dos tecidos.

Os fungos endofíticos podem afetar a sobrevivência, reprodução ou crescimento de plantas infectadas (Rice et al., 1990). No que se refere à relação entre produção de pastagem e níveis de N no solo, Arachevaleta et al. (1989), afirmam que em baixas taxas de N, plantas infectadas e não infectadas tiveram produções semelhantes, mas em altas e médias taxas de N, as plantas infectadas foram 67% mais produtivas. Os autores sugerem que, a maior produção das plantas infectadas em condições de altos teores de N, se deve à uma maior eficiência de utilização de nitrogênio e cita Lions (1985)², que afirma que plantas infectadas em altas taxas de N, têm alta atividade de glutamina sintetase devido a uma maior eficiência de reassimilação de NH_3 em lâminas infectadas de capim alto, que é uma planta C_3 e perde grande quantidade de NH_3 através da fotorrespiração.

De acordo com West et al. (1988), a produção final de pastagem foi significativamente maior em plantas de capim alto (*Festuca arundinacea* Schrb.) infectadas com o fungo endofítico *Acremonium coenophialum*. Todavia, a vantagem foi visível apenas em tratamentos não irrigados ou pouco irrigados, onde o estresse de seca foi maior. Os

² LIONS, P. C. Infection and in vivo ergot alkaloid synthesis by the tall fescue endophyte and effects of the fungus on host nitrogen metabolism. PhD diss., Univ. of Georgia, Athens. 1985.

autores sugerem que as plantas infectadas apresentam grande ajuste osmótico, o qual permite que plantas infectadas mantenham grande pressão de turgor sob condições de seca. Ainda com relação ao estresse de seca, Arachevaleta et al. (1989) afirmam que plantas de capim alto (*Festuca arundinacea* Schreb.) infectadas com o fungo endofítico *Acremonium coenophialum* e, anteriormente sujeitas a um severo estresse de seca, apresentam uma capacidade de rebrota mais rápida do que plantas não infectadas, sugerindo uma melhor vantagem competitiva de plantas infectadas sobre as não infectadas. Segundo os autores isso se deve ao metabolismo de carboidratos. Após a colheita a área foliar para a rebrota é insuficiente para produzir a energia necessária para ativar o crescimento. Assim, a eficiência de mobilização e translocação de reservas é mais importante que o atual nível acumulado. A produção de auxinas descrita por endofíticos (Porter et al., 1985) pode ainda controlar o movimento inicial de carboidratos e produzir uma rápida e eficiente mobilização de reservas resultando em aumento da capacidade de rebrota em contraste com plantas livres de endofíticos.

Segundo Clay (1989) estas alterações e também outras na morfologia foliar verificadas em gramíneas infectadas por endófitos, geralmente contribuem para o seu vigor, independentemente de resistência a insetos pois, plantas infectadas mostraram um aumento na taxa de crescimento em relação às não infectadas, mesmo em ambiente controlado sem a presença de insetos. Tal situação é claramente resultado de outros fatores. Portanto, o maior tamanho de plantas infectadas por endófitos na natureza e seu maior crescimento e sobrevivência em condições de campo, são, segundo Clay (1989), provavelmente devido a combinação de resistência a insetos e desses outros fatores.

2.5.2 Efeitos na Morfologia e Fisiologia Geral dos Hospedeiros

Infecções endofíticas causam mudanças na fisiologia da planta hospedeira que tem o seu crescimento estimulado sob condições ambientais controladas (Latch et al., 1985). Mais recentemente, White Jr. et al. (1993) afirmaram que os alcalóides produzidos por fungos endofíticos podiam causar alterações na fisiologia da planta hospedeira e, talvez, ter um papel na relação de nutrientes entre hifas do fungo e células hospedeiras. A semelhança estrutural de muitos destes alcalóides com auxinas produzidas pelas plantas, conhecidas por alterar as membranas e paredes das células, sugere tal mecanismo.

Visando estudar o efeito de fungos endofíticos na resposta da planta ao estresse ambiental, Arachevaleta et al. (1989), avaliaram as respostas morfológicas e fisiológicas de plantas de capim alto (*Festuca arundinacea* Schreb.), não infectadas e infectadas pelo fungo endofítico *Acremonium coenophialum* ao alagamento, taxas de fertilizantes nitrogenados e estresse de seca em casa de vegetação. Através de estudos de análise ultraestrutural feitas com o auxílio de microscopia eletrônica, os autores observaram grandes diferenças no tecido da bainha foliar após 60 dias. Independentemente do nível de N, as plantas infectadas apresentaram, aos 60 dias, grandes espaços (bolsas de ar) entre as células do mesófilo de bainhas foliares, enquanto que as plantas não infectadas não apresentaram alterações. Aos 90 dias, as diferenças entre plantas infectadas e não infectadas não podem mais ser observadas pois, aos 90 dias, as plantas não infectadas também desenvolveram bolsas de ar entre as células do mesófilo. Como as bolsas de ar aparecem com a idade, os autores sugerem que os fungos endofíticos possam acelerar a taxa de maturação da planta. Em colaboração com tal fato, os mesmos autores

observaram ainda que, em campo, o material infectado produziu sementes duas semanas mais cedo que plantas não infectadas. Dessa forma, os endofíticos podem interagir com alguns mecanismos de desenvolvimento da planta para alterar os processos de crescimento como por exemplo, através da produção de reguladores de crescimento. Para reforçar tal fato, auxinas tem sido encontradas em culturas puras do fungo endofítico *Balansia epichlõe* (Porter et al., 1985) e Latch et al. (1985), encontraram em falso centeio, giberelinas. As giberelinas que geralmente são responsáveis por estimular a expansão celular, foram consideradas pelos autores, como o fator que possivelmente promoveu o aumento da produção de pastagem em plantas infectadas.

De acordo com White Jr. et al. (1993), o processo que resulta em aparente aumento de suscetibilidade à seca, em gramíneas que apresentam estroma de *Epichlõe* (considerado patogênico-tipo I) não é distinto do mecanismo de aumento de tolerância à seca de algumas associações do tipo III (não patogênicas). Segundo West et al. (1990), o mecanismo de tolerância à seca em capim alto (*Festuca arundinacea* Schreb.) envolve um ajuste do potencial osmótico em zonas meristemáticas. Neste mecanismo, as células meristemáticas são embebidas em uma solução aquosa que é mais rica em solutos nas gramíneas infectadas do que em gramíneas não infectadas. O baixo potencial osmótico do fluido extracelular reduz a taxa de dessecação de células meristemáticas por fornecer uma zona de barreira à desidratação. Nas zonas meristemáticas de gramíneas onde os endofíticos proliferam, compostos semelhantes às auxinas podem induzir a liberação de sacarídeos para o desenvolvimento da parede celular, aumentando a concentração de solutos em torno dessas células. Assim, a diferença entre induzir qualquer suscetibilidade ou tolerância à seca, pode estar na

concentração de compostos induzidos. Em plantas que produzem estroma, altos níveis de compostos com atividade semelhante à auxina podem induzir o engrossamento celular e modificações evidentes no tecido. Estes desarranjos celulares diminuem a retenção de água nas células, aumentando a suscetibilidade à seca. Porém, em baixas concentrações desses mesmos compostos os efeitos seriam menos drásticos para a estrutura celular, talvez causando apenas um aumento na concentração de solutos na solução apoplástica (West et al., 1990).

Arachevaleta et al. (1989), mostraram que plantas infectadas apresentam lâminas foliares mais estreitas e espessas que plantas não infectadas e sugerem que o benefício dessa mudança morfológica possa estar relacionado com a conservação de água na planta e tolerância à seca. Os autores relataram ainda que, plantas infectadas exibem enrolamento de área foliar sob condições de estresse hídrico muito mais rapidamente do que plantas não infectadas, e que o enrolamento da folha pode funcionar como um mecanismo adaptativo que reduz a área foliar efetiva, diminuindo a quantidade de calor que atinge a superfície foliar, aumentando a tolerância à seca, a sobrevivência e melhorando a habilidade competitiva. Estresses ambientais extremos como o descrito acima podem fornecer forte pressão de seleção favorecendo plantas infectadas e causando mudanças dramáticas na composição da população.

2.6 Mudanças Metabólicas Induzidas por Infecção Fúngica

Leite & Pascholati (1995) afirmam que o tecido vegetal responde imediatamente à presença de microrganismos e, o simples contato entre eles representa um fator importante para desencadear uma

série de mecanismos de reconhecimento. Segundo Leegood & Scholes (1991), organismos biotróficos são patógenos altamente especializados. Eles necessitam de um contínuo suprimento de nutrientes do hospedeiro para o seu desenvolvimento e reprodução. Eles portanto coexistem com o hospedeiro por um certo período de tempo causando mudanças na sua fisiologia e metabolismo.

O conhecimento da maneira pela qual o fungo endofítico mobiliza e altera as funções fisiológicas e bioquímicas de um vegetal são muito importantes no estabelecimento das interações fungo-planta. Técnicas modernas de estudo *in vivo* (Leegood & Furbank, 1986 e Leegood et al. 1988), têm mostrado que é possível selecionar condições ambientais e verificar seu efeito sobre a fotossíntese através da fixação de CO₂, mecanismos de transporte de elétrons, conteúdo e síntese de carboidratos, entre outros. O uso de tais técnicas para estudos da vulnerabilidade da fotossíntese em plantas inoculadas com fungos endofíticos, tornou-se uma valiosa ferramenta permitindo avaliar-se as limitações metabólicas nestas plantas quando comparadas com plantas não inoculadas.

2.6.1 Metabolismo Fotossintético

Clay (1990) afirma que os mecanismos pelos quais fotossíntese e relações de água podem ser alterados pela infecção endofítica incluem mudanças no balanço hormonal da planta e mudanças na relação fonte-dreno. As mudanças morfológicas e/ou fisiológicas (por exemplo, inibição do florescimento), observadas em um número de

espécies hospedeiras, são consistentes com alterações no metabolismo hormonal (Clay, 1986).

Em resposta ao aumento da irradiação, a taxa fotossintética encontrada em clones de alguns genótipos de capim alto (*Festuca arundinacea* Schreb.) infectados por fungos endofíticos foi menor que a de clones livres de endofíticos, embora clones infectados tenham produzido mais biomassa e perfilhos (Belesky et al., 1987). Os autores observaram ainda, neste experimento, que a resistência estomática das plantas infectadas foi maior, sugerindo uma vantagem adaptativa para o crescimento das plantas infectadas sobre as não infectadas em ambientes com estresses abióticos. Ayres (1980) mostrou que fitoalexinas inibem a função estomatal e consequentemente, podem alterar a resposta fotossintética. Tal afirmativa também está de acordo com Arachevaleta et al. (1989) que mostraram que plantas infectadas por fungos endofíticos tendem a ter uma maior resistência estomática.

Estudos do metabolismo fotossintético em duas associações diferentes entre hospedeiros e endofíticos têm revelado que o fungo converte rapidamente a sacarose em álcoois de açúcar, os quais a planta é incapaz de metabolizar (Smith et al., 1985).

Em plantas infectadas por patógenos, Leite & Pascholati (1995) afirmam que a atividade fotossintética aumenta imediatamente após o início da interação com o patógeno, por um período bastante curto, seguido, invariavelmente, pela diminuição da taxa fotossintética, devido ao surgimento de áreas cloróticas à necrosadas, onde ocorre a destruição de moléculas de clorofila responsáveis pela captação de energia luminosa. Segundo Kenaga (1974), a resposta geral da folha após a infecção é a diminuição da atividade fotossintética.

Embora vários estudos tenham sido feitos abordando o comprometimento da atividade fotossintética, em plantas infectadas por patógenos, pouco se conhece a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos (Hutcheson & Buchanan, 1983). Na maioria dos casos, a influência dos patógenos sobre a fotossíntese é resultante dos danos causados aos cloroplastos e do processo de envelhecimento dos tecidos (Leite & Pascholati, 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Plantas Hospedeiras

3.1.1 *Musa cavendish*

A planta utilizada foi a bananeira (*Musa cavendish*), cultivar Nanicão, proveniente da região produtora do Vale do Ribeira-SP e do Campo Experimental da ESALQ-Piracicaba-SP. Estas plantas, foram mantidas na forma de clones, no Laboratório Central de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Genética da ESALQ.

Plantas axênicas de bananeira foram obtidas através da regeneração *in vitro* de meristemas apicais de plantas de campo, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 5,0 mg.l⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina), conforme metodologia descrita por Pereira (1993). As plantas micropropagadas foram mantidas em sala de cultivo e os brotos produzidos sucessivamente a partir de um meristema, constituíram os clones que sofreram transferências mensais para meio de cultura fresco. Estes clones foram utilizados nos experimentos de inoculação de endofíticos e de caracterização fotossintética.

3.1.2 *Zea mays* L.

As plantas axênicas de milho foram obtidas de sementes de milho (*Zea mays* L.), cultivar Piranão, provenientes do Departamento de Genética da ESALQ. As sementes foram inicialmente lavadas em água corrente por cerca de 30 minutos para retirada da sujeira mais grosseira. Em seguida, foram colocadas em água deionizada, contendo Tween 80, (0,1%), e mantidas sob agitação por 1 hora. A cada 20 minutos ocorreu a troca dessa solução por uma nova. Terminada essa lavagem, as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar e esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 3% (v/v), por 30 minutos. Após a esterilização as sementes foram colocadas em água destilada estéril para retirar o excesso de cloro. Em seguida foram mergulhadas em álcool 70%, flambadas e colocadas em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), para germinação.

3.2 Fungos Endofíticos Utilizados

Os fungos utilizados foram *Colletotrichum musae* e *Fusarium moniliforme*, inoculados em plantas de banana e milho, respectivamente. Estes fungos endofíticos são provenientes da coleção mantida pelo Departamento de Genética da ESALQ. Devido à existência de uma especificidade entre o fungo endofítico e a planta hospedeira, a escolha do endófito foi feita em função da frequência de sua presença, constatada nos diversos isolamentos realizados por Pereira (1993) e Pamphile et al. (1995), segundo metodologia proposta por Petrini (1986) e Pereira (1993).

3.2.1 Gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* compreende tanto organismos saprófitas quanto patógenos facultativos. Esses microrganismos causam uma série de doenças nas plantas, sendo a antracnose a mais importante delas devido aos problemas de pré e pós-colheita que essa doença provoca.

A classificação de espécie é muito confusa e baseia-se apenas na morfologia do fungo em seu substrato natural (tamanho e forma de conídios, presença de seta, esclerócio e forma de apressório) e, em uma menor extensão, na sua especificidade com o hospedeiro (Pereira, 1993). Das 39 espécies definidas, o *Colletotrichum musae* (Bert. et Curt.) v. Arx. é uma delas, não apresentando setas, nem esclerócios e com conídios freqüentemente alaranjados (Sutton, 1993).

3.2.2 Gênero *Fusarium*

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, como um invasor secundário ou um endófito.

O gênero Hyphomicete *Fusarium* é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias coloridas ou com coloração pálida, com micélio aéreo e difuso ou esporulação esporodoquial. A maioria das espécies de *Fusarium* é de fungos de solo com distribuição cosmopolita os quais são ativos na decomposição de substratos celulósicos das plantas e algumas espécies são parasitas de plantas (Domsch et al., 1980).

3.3 Inoculação de Fungos Endofíticos em Plantas Axênicas

A inoculação dos fungos endofíticos nas plantas hospedeiras foi feita através da aplicação de pequenas gotas de uma suspensão de esporos, coletados em Tween 80 (0,1%). A suspensão final continha aproximadamente 10^6 esporos. ml^{-1} de *Colletotrichum musae* e 10^6 esporos. ml^{-1} de *Fusarium moniliforme*, isolados de plantas de campo e inoculados em condições assépticas na superfície das folhas de plantas de banana e milho, respectivamente. A inoculação foi feita quando essas plantas ainda estavam nos frascos contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) (Figura 1). Apenas parte das plantas de banana e milho foram inoculadas, o restante das plantas foram mantidas em condições axênicas.

3.3.1 *Musa cavendish*

Os frascos contendo plantas axênicas e inoculadas de banana foram mantidos em câmara de crescimento controlado (Convicon PGW 36), por cerca de 15 dias, para adaptação. Nesta câmara, as condições de temperatura ($25^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$ -dia/noite), luminosidade ($200\text{-}250\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para as plantas de banana e $400\text{-}450\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para as plantas de milho), fotoperíodo (12 horas) e umidade (80%), foram controladas. Ao final dos 15 dias essas plantas foram transplantadas para vasos contendo areia esterilizada em estufa (8 horas à 170°C).

Figura 1: Plantas de banana (*Musa cavendish*) inoculadas com *Colletotrichum musae*. Os frascos com plantas axênicas e inoculadas foram mantidos em câmara de crescimento por 15 dias para adaptação.

3.3.2 *Zea mays* L.

Para o milho, as plantas axênicas e inoculadas foram diretamente transplantadas para vasos contendo areia esterilizada em estufa (8 horas à 170°C), após a inoculação com o fungo endofítico específico.

3.4 Sistema de Cultivo das Plantas

Para o cultivo das plantas axênicas e inoculadas em vasos, caixas plásticas (80cm x 40cm x 40cm) foram adaptadas para a colocação destes em seu interior. Essas caixas possuem altura suficiente para permitir um bom desenvolvimento das plantas, sendo separadas ao meio por uma chapa de acrílico, constituindo dois compartimentos e cobertas com tampa de acrílico transparente. Esta caixa apresenta na lateral, orifícios para a entrada de ar estéril, permitindo a ventilação no seu interior, cuja temperatura fica em torno de 27°C e 80% de umidade, mesmo em altas intensidades luminosas. Tem-se ainda na lateral dessa caixa, perfurações onde são fixados tubos plásticos para o fornecimento de solução nutritiva direta e individualmente em cada vaso (Figura 2). Dessa forma todo o material se mantém livre do contato com o meio externo e consequentemente protegido de contaminações indesejáveis. Cada caixa comporta cerca de 10 vasos, e foram mantidas em câmara de crescimento controlado (Convion PGW 36). Quando as folhas destas adquiriram tamanho ideal foram submetidas às análises (cerca de 45 dias para as plantas de banana e 30 dias para as de milho).

Figura 2: Sistema de cultivo de plantas axênicas e inoculadas em vasos.
As condições assépticas foram mantidas durante todo o período de crescimento das plantas.

3.5 Caracterização das Plantas Inoculadas e Axênicas quanto ao Potencial Fotossintético

As interações entre fungos endofíticos e vegetais podem causar alterações no metabolismo da planta hospedeira que irão refletir na atividade fotossintética das folhas. A caracterização das plantas quanto ao potencial fotossintético, compreendeu a comparação de vários parâmetros fisiológicos e metabólicos entre plantas axênicas e inoculadas com o endofítico específico quando expostas a diferentes intensidades luminosas e diferentes condições de CO₂, para saber como o metabolismo fotossintético foi alterado pela presença dos fungos endofíticos nas plantas inoculadas. Os parâmetros determinados foram: capacidade de fixação de CO₂, fluorescência da clorofila, conteúdo de clorofila total, conteúdo de carboidratos totais (amido e sacarose) e conteúdo de metabólitos.

3.5.1 Capacidade de Fixação de CO₂

3.5.1.1 *Musa cavendish*

A determinação da taxa fotossintética foi feita através de método polarográfico empregando um eletrodo tipo Clark (LD-2 Hansatech, Inglaterra), em plantas axênicas e inoculadas de banana. Foram utilizados discos foliares de 10 cm², em condições saturantes de CO₂ (5%), para suprimir a atividade fotorrespiratória e, em diferentes intensidades luminosas (50 a 1050 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As análises foram conduzidas à temperatura de 25°C.

3.5.1.2 *Zea mays* L.

A determinação da taxa fotossintética foi feita utilizando-se um analisador de gás infravermelho (IRGA - Infra-red Gas Analysers) (BINOS 100, Rosemount, Alemanha), que mede a taxa de absorção do CO₂ pela folha. O analisador está acoplado à uma câmara de alumínio. A câmara é constituída de dois blocos de alumínio com duas aberturas (janelas) cobertas com “Parafilm” e, entre estes blocos são inseridos segmentos de folhas destacadas ou intactas. Na face superior é fornecida luz actínica à(s) folha(s) localizada(s) entre os dois blocos de alumínio. As intensidades luminosas utilizadas variaram de 130 a 1350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A temperatura na câmara de análise da fotossíntese foi de 25°C, controlada através de um termocirculador. O sistema funciona associado a um aparelho de congelamento rápido de folhas, que permite o bloqueio instantâneo do metabolismo, à temperatura de -190°C (Figura 3A e B). A determinação da taxa de absorção de CO₂ foi obtida comparando-se as concentrações de CO₂ na mistura gasosa anterior à entrada na câmara, e após a passagem pela folha. Assim, pôde-se medir quanto a folha estava absorvendo de CO₂ por unidade de área por tempo. Para as plantas de milho, as análises foram conduzidas em condições atmosféricas de CO₂. A taxa de assimilação líquida de CO₂ pela folha foi determinada pela seguinte fórmula (von Caemmerer & Farquhar, 1981; Long & Hällgren, 1985):

$$A=(f/S) \times \Delta\text{CO}_2 \times [(1-e_e/P)/(1-e_0/P)]$$

onde:

A: taxa de assimilação líquida de CO₂ por unidade de área foliar
($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

S: área foliar (0,0008553 m²)

$f = F \times (1/22,4) \times [273,15/(273,15 + T)] \times (P/101,3) \times (1/60)$ (mol.s⁻¹)

onde:

F: vazão do ar (l/min)

T: temperatura da câmara

ΔCO_2 : diferencial de CO₂ (ppm)

e_e : pressão parcial de vapor d'água antes da câmara (Kpa)

e_0 : pressão parcial de vapor d'água após a câmara (Kpa)

P: pressão atmosférica (Kpa)

3.5.2 Fluorescência da clorofila *a*

A energia luminosa que é absorvida pelas moléculas que compõem o sistema coletor de luz dos fotossistemas I e II (LHCI e LHCII- “Light Harvesting Complex”) é, em parte, transferida aos centros de reação dos fotossistemas, onde ocorrem as primeiras reações fotoquímicas e, em parte é perdida como calor ou por emissão de fluorescência

Estudos de quantificação da fluorescência da clorofila, fornecem uma série de informações sobre os mecanismos de regulação do transporte de elétrons nos tilacóides e da fixação do CO₂ no estroma. À temperatura ambiente, a fluorescência da clorofila é originada das moléculas de clorofila *a* associadas ao fotossistema II (PSII) (Krause & Weis, 1991). Quando um quanta de luz atinge a superfície foliar, é captado pelos sistemas coletores (clorofilas *a*, *b*, xantofilas e carotenos) associados ao PSII. A energia transferida para o PSII é utilizada na

Figura 3A: Câmara de análise da fotossíntese acoplada ao sistema de congelamento rápido de folhas.

Figura 3B: Sistema de congelamento rápido associado ao analisador de gás infravermelho (IRGA) e fluorômetro, usados para medida de absorção de CO_2 e fluorescência da clorofila a .

excitação de moléculas de clorofila *a* que perdem um elétron para a Quinona A (Q_A). Com a perda desses elétrons tem-se a formação de um forte agente oxidante que promove a quebra da molécula de água, liberando elétrons que serão transferidos do PSII para o PSI, gerando ATP e NADPH. O fluxo contínuo de elétrons nas membranas dos tilacóides promove uma diminuição da fluorescência da clorofila. Caso ocorra alguma restrição no transporte de elétrons, a Q_A permanece no estado reduzido (Q_A^-) não sendo capaz de promover qualquer reação fotoquímica. Assim, a Q_A^- fica impossibilitada de transferir ou receber elétrons da clorofila *a* e como consequência tem-se a dissipação do excesso de energia na forma de fluorescência (685 nm). Dessa forma, pode-se concluir que, em condições ótimas para a realização da fotossíntese, a proporção de energia luminosa absorvida que é emitida na forma de calor ou como fluorescência é baixa. Já em condições ambientais desfavoráveis, aumenta a emissão de energia na forma de calor e/ou fluorescência, provocando de-excitação da energia luminosa absorvida.

A produção de fluorescência *in vivo* é diminuída por dois mecanismos diferentes denominados mecanismos de “quenching” (Krause & Weis, 1991). A metodologia de análise desenvolvida por Schreiber et al. (1986) permite analisar a diminuição (“quenching”) da intensidade da fluorescência da clorofila em componentes fotoquímicos (q_P) e não fotoquímicos (q_N). O componente fotoquímico indica a medida do “quenching” da fluorescência atribuída à proporção do PSII que está no estado oxidado ou aberto, ou seja, centros de reação que são capazes de transferir um elétron para um aceptor num determinado momento (Schreiber et al., 1986; Krause & Weis, 1991). Por outro lado, $1 - q_P$ representa a relativa extensão de redução da Q_A . Todavia, a fluorescência

pode ser diminuída por mecanismos não diretamente relacionados com o estado de redução da Q_A . Tais mecanismos, denominados de “quenching” não fotoquímico ou q_N , podem ser causados *in vivo*, sob condições fisiológicas, por vários fatores (Bilger & Schreiber, 1986; Quick & Stitt, 1989; Genty et al., 1989; Krause & Weis, 1991 e Buschmann, 1995):

a) “Quenching” dependente de energia (q_E): O q_E está relacionado com a acidificação do lúmen do tilacóide que ocorre na luz e a formação de ΔpH entre o lúmen do tilacóide e o estroma.

b) “Quenching” de transição (q_T): ocorre devido a perda de energia na transição do estado 1-estado 2. É regulado pela fosforilação do LHC-II.

c) “Quenching” fotoinibitório (q_I): Está relacionado com a inibição da fotossíntese por iluminação com extremas intensidades de luz.

d) “Quenching” de F_0 : Considera a diminuição da fluorescência de F_0 atribuída à mudanças de transferência de energia no sistema de antena coletora de luz.

O “quenching” não fotoquímico representa a perda de energia por outros meios que não por fluorescência da clorofila ou por processos fotoquímicos, resultando num aumento da produção de calor (Buschmann, 1995). Como consequência, o aumento do q_N produz uma redução na capacidade de transferência de energia do PSII para os demais componentes do sistema de transporte de elétrons. O “quenching” é quantificado pelo coeficiente q ($0 < q < 1$).

A eficiência quântica do transporte de elétrons do PSII (ϕ_{PSII}), é determinada pela eficiência com que um quantum absorvido pode alcançar um centro de reação e a proporção de centros de reação que são capazes de transferir um elétron para um aceptor num determinado momento (Genty et al., 1989). Assim, de acordo com a metodologia

proposta por Genty et al. (1989), a eficiência de transferência de elétrons do PSII, ϕ_{PSII} pode ser estimada pelo produto: $q_P \times F'_V/F'_M$, onde F'_V/F'_M representa a eficiência da captura da energia de excitação pelos centros de reação do PSII em folhas adaptadas na luz.

As análises da fluorescência da clorofila em plantas axênicas e inoculadas de banana e milho, foram feitas utilizando-se a metodologia descrita por Schreiber et al. (1986) e Genty et al. (1989), avaliando-se a emissão de fluorescência da clorofila da superfície superior das folhas. Foram aplicadas as terminologias e cálculos propostos por van Kooten & Snel (1990) (Figura 4).

3.5.2.1 Análise da Fluorescência da Clorofila

3.5.2.1.1 *Musa cavendish*

Para as análises de fluorescência da clorofila em plantas axênicas e inoculadas de banana, estas foram mantidas pôr aproximadamente uma hora no escuro, para a completa oxidação dos componentes do sistema de transporte de elétrons. Em seguida, mantendo o máximo de condição de escuro possível, foi colocada na parte superior das folhas a serem analisadas, um fluorômetro (PAM 101 Walz-Effeltrich-Alemanha) que permitiu a determinação de parâmetros como F_0 e F_M , utilizados para se estimar o ϕ_P^{open} conforme metodologias de Kitajima & Butler (1975) e Havaux (1992 e 1994). O ϕ_P^{open} é uma estimativa da máxima eficiência do fotossistema II (PSII) quando todos os componentes do transporte de elétrons da membrana se encontram no estado oxidado; após um longo período de escuro, e foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

Figura 4: Padrão de resposta do “quenching” da fluorescência da clorofila *a* pelo método dos pulsos saturantes. A: luz modulada (frequência 1,6 kHz) para a obtenção de F_0 ; B: pulso de luz saturante (aproximadamente $15000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) para a obtenção de F_M ; C: luz actínica contínua ligada simultaneamente com o pulso de luz saturante (a cada 20 segundos). Dependendo das condições de luz, cinco estados diferentes são distinguidos, correspondendo a pontos característicos da produção de fluorescência e coeficientes de “quenching”. *Indicadores de intensidade de fluorescência*- F_0 : fluorescência mínima (intensidade de fluorescência com todos os centros de reação do PSII abertos enquanto a membrana do tilacóide está no estado não energizado, isto é, adaptada no escuro); F_M : fluorescência máxima (intensidade de fluorescência obtida quando todos os centros de reação do PSII estão fechados no estado adaptado no escuro); F_V : fluorescência variável máxima obtida quando todos os processos não fotoquímicos são mínimos ($q_N=0$); F'_M : fluorescência máxima com todos os centros de reação do PSII fechados em qualquer estado adaptado na luz; F_S : fluorescência no estado fixo, isto é, a fluorescência não muda enquanto os fatores externos permanecerem constantes, F'_V : fluorescência variável máxima em qualquer estado adaptado na luz; F'_0 : fluorescência mínima em qualquer estado adaptado na luz. *Parâmetros de fluorescência*- q_p : “quenching” fotoquímico e q_N : “quenching” não fotoquímico.

$$\phi_P^{\text{open}} = F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$$

onde:

F_M : fluorescência máxima obtida quando todos os centros de reação do PSII estão fechados (reduzidos), isto é, no estado adaptado no escuro ($q_P=0$ e $q_N=0$);

F_0 : fluorescência mínima obtida com todos os centros de reação do PSII abertos enquanto a membrana do tilacóide está no estado não energizado, isto é, adaptado no escuro ($q_P=1$ e $q_N=0$).

3.5.2.1.2 *Zea mays* L.

Em plantas de milho, a fluorescência da clorofila, foi medida juntamente com as análises de assimilação de CO_2 . O fluorômetro (PAM 101 Walz-Effeltrich-Alemanha), estava equipado com um PAM 103 (unidade de controle de disparo de pulsos saturantes), um sistema bifurcado de fibras óticas e duas fontes de luz KL 1500 Schott (Schott, Mainz, Alemanha) onde, uma foi destinada ao fornecimento de pulsos de luz saturante ($\cong 15000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a cada 20 segundos) e a outra para o fornecimento de luz actínica. Todo equipamento descrito estava acoplado à câmara de análise da fotossíntese (Figura 3A e 3B) permitindo as análises simultaneamente. Além do ϕ_P^{open} , outros parâmetros como q_P , q_N , F'_V/F'_M e ϕ_{PSII} , também puderam ser determinados nestas plantas e foram obtidos de acordo com as seguintes fórmulas:

$$q_P: F'_M - F_S / F'_M - F_0$$

$$q_N: 1 - [F'_M - F'_0 / F_M - F_0]$$

$$F'_V / F'_M: F'_M - F'_0 / F'_M$$

$$\Phi_{PSII}: q_P \times F'_V / F'_M = q_P \times F'_M - F'_0 / F'_M$$

onde:

F_0 : fluorescência mínima obtida em folhas adaptadas ao escuro;

F'_0 : fluorescência mínima obtida em folhas após a iluminação actínica;

F_M : fluorescência máxima obtida em folhas adaptadas ao escuro;

F'_M : fluorescência máxima obtida em folhas adaptadas à luz;

F_S : fluorescência no “steady-state” (equilíbrio) ($q_P > 0$);

F_V : fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptadas ao escuro;

F'_V : fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptadas à luz.

3.5.3 Reisolamento de Endofíticos:

Ao final das análises da fotossíntese parte do tecido foliar foi utilizado para a verificação da eficiência do processo de inoculação. Tal procedimento visava obter o reisolamento dos fungos endofíticos nas plantas inoculadas e verificar se o material axênico não apresentava outros microrganismos contaminantes. A metodologia utilizada para o reisolamento dos fungos foi modificada de Petrini (1986), e se baseou na esterilização da superfície do material que está sendo investigado eliminando-se todos os organismos epifíticos. O processo de esterilização

consistiu na lavagem da amostra foliar em álcool 96% por 30 segundos, que teve por finalidade umedecer e quebrar a tensão superficial existente nos órgãos e tecidos, seguido de um banho em solução de hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 3 minutos que inviabiliza esporos e fragmentos de hifas aderidos à superfície dos hospedeiros. Em seguida, o tecido foi mergulhado em água destilada estéril por um minuto, para a retirada do excesso de cloro. O tecido foi então fragmentado e colocado em placas de Petri contendo meio completo sólido (Pontecorvo et al., 1953) e incubados em B.O.D. a 28°C para as placas com fragmentos de folhas de banana e 25°C para as placas com fragmentos de folhas de milho.

3.5.4 Determinação do Conteúdo de Clorofila Total

3.5.4.1 *Musa cavendish*

A determinação do conteúdo de clorofila total foi feita utilizando-se metade do disco foliar de banana que foi submetido as análises da fotossíntese. O tecido foliar foi inicialmente macerado em nitrogênio líquido até a completa pulverização. Adicionou-se então 10 ml de acetona 80% (5 ml para mistura e 5 ml para lavagem), obtendo-se um extrato que foi então colocado em tubos e mantidos por uma noite em câmara fria para a total extração dos pigmentos. As leituras de absorbância foram feitas a partir do sobrenadante, utilizando-se um espectrofotômetro (HITACHI, modelo U3300, Tokyo, Japão), a 652 nm para determinação de clorofila total de acordo com Arnon (1949), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Chl}_{\text{Total}} = [A_{652} \times 1000/34,5] \times (V/1000)$$

onde:

$\text{Chl}_{\text{Total}}$: concentração de clorofila total (mg de clorofila/ml da amostra);

A_{652} : absorvância a 652 nm;

V: volume de acetona 80% (ml).

3.5.4.2 *Zea mays* L.

A determinação do conteúdo de clorofila total em plantas de milho, foi feita utilizando-se metade do disco foliar submetido às análises de assimilação de CO_2 . Como as amostras foliares de milho foram também utilizadas para a determinação do conteúdo de metabólitos e carboidratos, a determinação do conteúdo de clorofila total, foi feita após a extração com ácido perclórico (HClO_4), como descrito no item 3.5.5.

3.5.5 Preparo do Extrato Foliar

Ao final das análises de absorção de CO_2 em plantas de milho, as amostras foliares foram destinadas à extração de amido, sacarose e metabólitos do ciclo de Calvin (item 3.5.7). Para tal, o sistema de congelamento rápido (Figura 3A e 3B) foi acionado, permitindo o bloqueio instantâneo do metabolismo à temperatura de -190°C . O sistema de congelamento rápido de folhas, consiste de dois pistões pneumáticos, localizados na parte superior e inferior da câmara de análise fotossintética, acionados por ar comprimido. Nas extremidades de cada

pistão são encaixados, segundos antes do acionamento das válvulas, dois cilindros pequenos de cobre que permanecem imersos em nitrogênio líquido (-190°C). Em uma fração de segundos, os dois pistões rompem as membranas de “Parafilm” que recobrem as janelas da câmara de análise fotossintética, congelando a folha que fica comprimida entre os dois cilindros de cobre. Imediatamente após o congelamento, a amostra foliar foi coletada e armazenada em nitrogênio líquido. A extração de metabólitos foi feita conforme metodologia descrita por Lowry & Passonneau (1972), utilizando o ácido perclórico, como descrito no item 3.5.5.1.

3.5.5.1 Extração com Ácido Perclórico

Num almofariz pré-resfriado, parte do disco foliar de milho, foi macerado em nitrogênio líquido com 1 ml de HClO_4 (ácido perclórico) 10% (v/v) até completa pulverização. O extrato obtido após a pulverização, foi transferido para tubos de centrifuga do tipo “Eppendorf”, previamente colocados no gelo. Em seguida o almofariz foi lavado com mais 0,5 ml de HClO_4 a 1% (v/v), e acrescido ao extrato que estava no gelo. Em seguida, foi centrifugado à aproximadamente 14000 rpm por 2 minutos. O volume no tubo foi marcado com auxílio de um gilete e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo. O volume marcado foi tomado como volume do extrato e o “pellet” foi utilizado para a determinação da clorofila (item 3.5.6). A seguir, foi feita a neutralização do sobrenadante à pH 6,5-7,0, com K_2CO_3 5M, através do uso de uma microseringa. Adicionou-se ao sobrenadante neutralizado, cerca de 200 μl de uma suspensão de carvão ativado (200 mg/ml) e centrifugou-se por

mais 2 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante obtido foi devidamente identificado e consistiu do extrato foliar utilizado nas análises de metabólitos.

3.5.6 Determinação da Feofitina

Em condição de extração ácida, a clorofila é convertida à feofitina. O “pellet” resultante da centrifugação do tecido foliar de milho, macerado com HClO_4 , foi transferido para um tubo com 10 ml de acetona 80% (v/v). Agitou-se e deixou-se à temperatura ambiente por uma noite para a completa extração dos pigmentos. O sobrenadante foi centrifugado por 5 minutos à 14000 rpm e a absorbância foi medida contra um branco de acetona 80%, a 666 e 655 nm para determinação do conteúdo de feofitina através da seguinte fórmula (Vernon, 1960):

$$\text{mg de feofitina.ml}^{-1} = [26,03 \times A_{655} + 6,75 \times A_{666}] \times (V/1000)$$

onde:

A_{666} : absorbância a 666 nm;

A_{655} : absorbância a 655 nm;

V: volume de acetona 80% (ml).

3.5.7 Determinação do Conteúdo de Amido, Sacarose e Metabólitos

Estas determinações foram feitas por espectrofotometria, através de reações enzimáticas acopladas que utilizam NADH ou NADPH. As determinações basearam-se na mudança de absorbância, no comprimento de onda de 340 nm, que ocorre quando o NADH ou NADPH passam do estado reduzido para oxidado ou vice-versa. Dessa forma, de uma mesma amostra de folhas pôde-se obter múltiplas informações sobre os diferentes componentes da fotossíntese, identificando os mecanismos regulatórios em função de variações na intensidade luminosa. A quantidade de extrato foliar utilizado variou de 50 a 100 µl, perfazendo um volume total de 1 ml. As enzimas utilizadas foram da Boehringer Mannheim (W. Germany).

3.5.7.1 Extração do Amido

Ao “pellet” esbranquiçado, proveniente do procedimento de extração de clorofila, foi adicionado 0,5 ml de MES (ácido 2-[N-Morfolino]etano-sulfônico) 0,5M (pH 4,5), misturado e centrifugado por 2 minutos à 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado repetindo-se o procedimento por mais duas vezes. Em seguida, o “pellet” foi ressuspenso em mais 0,5 ml de MES 0,5M (pH 4,5). A suspensão foi então tratada com 14 unidades de amiloglucosidase e 0,4 unidades de α -amilase, e deixada à temperatura ambiente por uma noite. Após esse período, a suspensão foi centrifugada, o “pellet” formado foi descartado e o sobrenadante, que constituiu a amostra a ser utilizada nas análises do conteúdo de amido, foi mantida em nitrogênio líquido.

3.5.7.1.1 Análise do Conteúdo de Amido

O ensaio para determinação do conteúdo de amido continha 100mM de Hepes (pH 7,0), 5mM de MgCl_2 , 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 0,02% (p/v) de BSA, 40 mM de NADP e 0,1 M de ATP. À esta reação adicionou-se 3 unidades de hexoquinase, seguido de 0,5 unidades de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-dh).

3.5.7.2 Determinação do Conteúdo de Sacarose

O ensaio para a determinação do conteúdo de sacarose foi o mesmo descrito para a determinação do conteúdo de amido, acrescido de 0,5 unidades de fosfogluose isomerase (PGI) e 100 unidades de β -frutoseidase.

3.5.7.3 Determinação do Conteúdo de Ácido 3-fosfoglicérico (PGA)

O ensaio para a determinação do conteúdo de PGA continha 50mM de Imidazole-HCl, 1mM de MgCl_2 , 20mM de NaCl e 2mM de β -mercaptoetanol, ajustados a pH 7,1. Acrescentou-se a esta reação 50 mM

de NADH, 1 mM de ATP, 11 unidades de PGK (fosfoglicerato kinase) e 11 unidades de GAP-dh (gliceraldeído-3-desidrogenase).

3.5.7.4 Determinação do Conteúdo de Piruvato (PIR) e Fosfoenolpiruvato (PEP)

O ensaio para a determinação do conteúdo de PIR+PEP continha 30mM de KH_2PO_4 , 20mM de NaH_2PO_4 e 2mM de MgCl_2 , ajustados a pH 7,0, acrescidos de 40 mM de NADH, 100 mM de ADP. Adicionou-se a esta reação 0,2 unidades de lactato desidrogenase (LDH) para determinação do conteúdo de piruvato (PIR) e 0,15 unidades de piruvato kinase (PK) para determinação do conteúdo de fosfoenolpiruvato (PEP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação e Reisolamento de Fungos Endofíticos em Plantas de Banana e Milho:

Observou-se que a técnica de inoculação usada foi bastante eficiente pois, apesar dos fungos utilizados serem potencialmente fitopatogênicos, as plântulas resistiram bem ao processo de inoculação e evidenciaram, ainda, o caráter assintomático dessas infecções, que está de acordo com os relatos de infecções latentes segundo Pereira (1993). Observou-se ainda que, plantas originadas de sementes germinadas *in vitro*, assim como plantas regeneradas de cultura de tecidos, ambas totalmente axênicas, são passíveis de reinfecção. Como pode ser visto nas Figuras 5A e 5B, as placas que continham fragmentos de folhas de banana e milho inoculados, foi possível o reisolamento de *Colletotrichum musae* e de *Fusarium moniliforme*, respectivamente. Os fungos foram isolados do tecido foliar submetido às análises. As placas que continham fragmentos de folhas de banana e milho, livre de endofíticos, não apresentaram crescimento de colônias de fungos, mostrando o caráter axênico do tecido foliar analisado. O sucesso obtido no reisolamento de fungos endofíticos nas plantas inoculadas, serviu para confirmar que, as diferenças encontradas nas análises da fotossíntese se deviam à presença do fungo. Nas condições de desenvolvimento

Figura 5: **A**-Reisolamento do fungo endofítico *Colletotrichum musae* de fragmentos de tecido foliar de banana e, **B**-Reisolamento do fungo endofítico *Fusarium moniliforme* de fragmentos de tecido foliar de milho, submetidos à esterilização da superfície com hipoclorito de sódio 3%, após análise da fotossíntese.

utilizadas nas análises (cerca de 45 dias para as plantas de banana e 30 dias para as de milho), não foram observadas diferenças visuais entre plantas inoculadas e axênicas, como a ocorrência de clorose, lesões ou crescimento anormal das plantas.

4.2 Efeito da Presença de Endofíticos no Metabolismo Fotossintético em Plantas de Banana e Milho:

4.2.1 Capacidade de Fixação de CO₂, Conteúdo de Clorofila Total e ϕ_p^{open}

As curvas de resposta da fotossíntese em função do aumento na intensidade de luz mostram a existência de diferenças na capacidade fotossintética entre plantas axênicas e infectadas tanto de banana quanto de milho. A Figura 6 apresenta as curvas de resposta da fotossíntese em banana. Observa-se que as plantas inoculadas apresentaram uma saturação da taxa de evolução de O₂ a uma intensidade de luz menor que as plantas axênicas, ou seja, com o aumento da intensidade luminosa, a capacidade fotossintética das plantas inoculadas de banana foi menor quando comparadas com as plantas axênicas. A fotossíntese nas plantas axênicas de banana aumentou até cerca de 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, atingindo o valor máximo de 13,54 $\mu\text{mol O}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Neste experimento as plantas foram comparadas após 45 dias do transplântio para os vasos contendo areia esterilizada em estufa.

A figura 7 apresenta as curvas de resposta da fotossíntese de milho, onde observa-se que as plantas inoculadas apresentaram uma saturação da absorção de CO₂ a uma intensidade de luz

Figura 6: Curva de resposta da taxa de evolução de O_2 em função do aumento na intensidade de luz em plantas de banana axênicas (●) e inoculadas (○) com *Colletotrichum musae*. Os dados representam uma média de 7 plantas axênicas e 5 plantas inoculadas. A taxa de evolução de O_2 foi analisada em condições saturantes de CO_2 (5%), à 25°C.

Figura 7: Curva de resposta da taxa de fixação de CO₂ em função do aumento na intensidade de luz em plantas de milho axênicas (▼) controle (●) e inoculadas (▽) com *Fusarium moniliforme*. Os dados representam uma média de 6 plantas axênicas, 7 plantas inoculadas e 8 plantas controle. A taxa de fixação de CO₂ foi analisada em condições ambientes de CO₂, à 25°C.

menor do que as plantas axênicas. Assim, à medida que a intensidade luminosa aumenta, a assimilação do CO₂ nas plantas axênicas de milho aumentou, atingindo valores superiores aos das plantas inoculadas. As plantas controle, cujas sementes não sofreram qualquer tratamento de desinfecção, foram semeadas nas mesmas condições das plantas axênicas e inoculadas. Estas plantas não apresentaram saturação da taxa fotossintética com o aumento da intensidade de luz. As plantas de milho foram comparadas 30 dias após o transplântio para os vasos.

A menor taxa fotossintética observada em plantas inoculadas de banana e milho, indica que a presença do fungo deve estar causando alguma limitação na assimilação do CO₂. O reisolamento dos fungos do tecido foliar das plantas inoculadas submetidas às análises oferece uma forte evidência de que no início do desenvolvimento das plantas a presença do fungo causa alteração no metabolismo.

A quantificação do conteúdo de clorofila total na folha pode dar uma idéia da atividade fotossintética da folha. A destruição das moléculas de clorofila pela ação de patógenos é apontada como um dos fatores que levam à diminuição da taxa de fotossíntese em tecidos de plantas doentes (Kenaga, 1974; Goodman et al. 1986; Leite & Pascholati, 1995; Raggi, 1995). As Tabelas 1 e 2 apresentam os dados de conteúdo de clorofila total, e da máxima eficiência quântica da conversão de energia pelo fotossistema II (ϕ_P^{open}) em plantas de banana e milho, respectivamente.

Como pode ser visto na Tabela 1, o conteúdo de clorofila total em plantas de banana, mostra um ligeiro aumento nas plantas axênicas (244 mg clorofila.m⁻²), cerca de 20% superior ao obtido para as plantas inoculadas (196 mg clorofila.m⁻²). Em milho, os conteúdos de clorofila

total, encontrados tanto para as plantas axênicas (158 mg clorofila.m⁻²) quanto para as plantas controle (150 mg clorofila.m⁻²), foram muito próximos, porém bastante superiores ao valor encontrado para as plantas inoculadas (85 mg clorofila.m⁻²) como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 1: Valores de ϕ_p^{open} (máxima eficiência do PSII) e conteúdo de clorofila total (mg de clorofila. m⁻²) em plantas de banana. Os dados representam uma média de 10 plantas axênicas e 7 plantas inoculadas com *Colletotrichum musae* $\pm$ o desvio padrão.

Plantas	ϕ_p^{open}	Clorofila Total
Axênicas	0,74 $\pm$ 0,01	244 $\pm$ 34
Inoculadas	0,63 $\pm$ 0,05	196 $\pm$ 38

Apesar das plantas inoculadas, tanto de banana quanto de milho, não terem apresentado áreas cloróticas ou lesões que poderiam levar à destruição de partes do tecido foliar ativo, as análises do conteúdo de clorofila total mostram que estas plantas possuem conteúdos de clorofila menores que o das plantas axênicas e controle. Isto sugere inicialmente que as menores taxas fotossintéticas estariam associadas ao menor conteúdo de clorofila total encontrado nessas plantas. Segundo Goodman et al. (1986), as interações hospedeiro-patógeno onde o processo doença termina em necrose, a fotossíntese líquida é afetada

primariamente pela degeneração dos cloroplastos, resultando na perda de clorofila e na redução da fixação de CO_2 .

Tabela 2: Valores de ϕ_p^{open} (máxima eficiência do PSII) e conteúdo de clorofila total (mg de clorofila. m^{-2}), em plantas de milho. Os dados representam uma média de 6 plantas controle, 7 plantas axênicas e 7 plantas inoculadas com *Fusarium moniliforme* $\pm$ o desvio padrão.

Plantas	ϕ_p^{open}	Clorofila Total
Controle	0,77 $\pm$ 0,01	150 $\pm$ 25
Axênicas	0,74 $\pm$ 0,03	158 $\pm$ 35
Inoculadas	0,71 $\pm$ 0,07	85 $\pm$ 21

Outro parâmetro determinado nessas culturas foi o ϕ_p^{open} . O valor de ϕ_p^{open} é um parâmetro importante e fácil de ser medido, indicando o estado fisiológico do aparato fotossintético em folhas intactas (Krause & Weis, 1991). O valor de ϕ_p^{open} é uma medida da eficiência máxima das reações fotoquímicas do PSII e representa a máxima eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação do PSII em folhas adaptadas no escuro. Varia entre 0,75 e 0,85 entre folhas de diferentes espécies e ecótipos (Kitajima & Butler, 1975; Butler & Kitajima, 1975; Krause & Weis, 1991; Havaux, 1992 e 1994). Estresses ambientais, causados por fatores bióticos ou abióticos, que

afetam a eficiência do PSII levam a uma diminuição do ϕ_p^{open} (Krause & Weis, 1991). Na Tabela 1, pode-se observar que as plantas axênicas de banana apresentaram um valor de ϕ_p^{open} bem próximo do valor esperado para uma planta que não está sofrendo qualquer tipo de estresse (0,74). Por outro lado, o valor observado nas plantas inoculadas foi menor (0,63), indicando que essas plantas estão sofrendo algum tipo de estresse, provavelmente em função da presença do fungo. Tanto as plantas axênicas quanto as plantas controle e as inoculadas de milho apresentaram valores de ϕ_p^{open} bem próximos do valor esperado para uma planta que não está sofrendo qualquer tipo de estresse (Tabela 2).

Os menores valores de ϕ_p^{open} apresentados pelas plantas de banana inoculadas evidenciam que essas plantas estão, do ponto de vista de eficiência quântica do PSII e, conseqüentemente geração de ATP e NADPH, sendo bastante afetadas pela presença do fungo. A menor alteração nos valores de ϕ_p^{open} entre as plantas de milho mostram que do ponto de vista de eficiência quântica dos PSII abertos, as plantas inoculadas de milho estão sendo pouco afetadas pela presença do fungo.

A redução na capacidade fotossintética das plantas inoculadas poderia ainda ser provocada pelo metabolismo do próprio fungo, que estaria absorvendo produtos fotoassimilados e produzindo toxinas. A produção de tais compostos levaria à alterações na fisiologia da planta (Porter, 1977 e 1985; Latch et al., 1985; Lindstron et al., 1993; White Jr. et al., 1993 e Lindstron & Belanger, 1994). Esses compostos poderiam ter papel na partição de nutrientes e metabólitos entre hifas do fungo e células hospedeiras, comprometendo a atividade fotossintética. Os compostos produzidos pelos fungos endofíticos poderiam, segundo Carroll (1988), beneficiar as plantas por repelirem herbívoros, porém

exigiriam dessa um custo metabólico alto, por desvio de energia para o metabolismo do fungo. Tal custo, poderia levar à perda da função reprodutiva dessas plantas.

Segundo Scholes et al. (1994), nos últimos anos um grande número de mecanismos têm sido propostos para descrever mudanças na fisiologia das plantas infectadas por patógenos. Tais mecanismos incluem a inibição do transporte não cíclico por produção de toxinas ou por destruição do complexo citocromo b_f , redução no conteúdo e atividade da Rubisco, aumento na respiração do hospedeiro e/ou fungo e, para plantas com metabolismo C_3 , o sequestro de Pi do citoplasma do hospedeiro, pelo fungo, levando à uma redução na reciclagem de Pi no cloroplasto.

A presença de fungos endofíticos no espaço intercelular de lâminas foliares poderia, ainda, mediar a atividade estomática aumentando a atividade respiratória no hospedeiro e/ou patógeno e desse modo, afetar a atividade fotossintética das plantas inoculadas (Ayres, 1980; Arachevaleta et al., 1989). Segundo Leite & Pascholati (1995) em termos gerais, a taxa de respiração aumenta em um tecido doente ou injuriado e, contrariamente a taxa de fotossíntese tende a diminuir. Belesky et al. (1987), trabalhando com capim alto (*Festuca arundinacea* Schreb.), infectada com o fungo endofítico *Acremonium coenophialum* também observou uma menor taxa de fotossíntese nas plantas infectadas, enquanto que a resistência estomática foi maior. Os autores consideraram esses resultados como uma vantagem adaptativa para o crescimento das plantas infectadas sobre as não infectadas em ambientes com estresses abióticos.

Os efeitos negativos observados nas plantas inoculadas poderiam ainda estar associados à fase de desenvolvimento da planta.

Dessa forma, os efeitos negativos do fungo poderiam ser revertidos na planta adulta.

4.2.2 Conteúdo de Amido, Sacarose e de Metabólitos

Os valores do conteúdo de amido, sacarose e de carboidratos totais obtidos em plantas de milho axênicas, inoculadas com *Fusarium moniliforme* e plantas controle (sem desinfecção de sementes), podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Conteúdo de amido, sacarose e carboidratos totais (μmol de hexoses equivalentes. mg^{-1} de clorofila), em plantas de milho. Os dados representam uma média de 5 plantas axênicas, 5 plantas controle e 5 plantas inoculadas com *Fusarium moniliforme* $\pm$ o desvio padrão.

Plantas	Amido	Sacarose	CHOs Totais
Inoculadas	5,13 $\pm$ 1,0	4,1 $\pm$ 1,1	9,2 $\pm$ 2,1
Axênicas	4,03 $\pm$ 1,48	27,0 $\pm$ 8,8	31,0 $\pm$ 10,3
Controle	0,65 $\pm$ 0,36	16,6 $\pm$ 1,8	17,2 $\pm$ 2,16

A partição do carbono em amido e sacarose mostrou-se bastante distinta nos diferentes materiais. As plantas inoculadas não apresentaram diferenças na partição do carbono, com conteúdo ligeiramente maior de amido em relação à sacarose. Nas plantas axênicas

e controle há total predomínio da síntese de sacarose. Considerando o conteúdo de carboidratos totais, as plantas axênicas acumulam cerca de três vezes mais do que as plantas inoculadas. Da mesma forma, as plantas controle possuem cerca de metade do conteúdo de carboidratos totais em relação ao material axênico.

Estes resultados evidenciam que as plantas de milho inoculadas além de apresentarem uma menor capacidade fotossintética, possuem menor conteúdo de carboidratos totais e maior conteúdo de amido. Isto sugere, inicialmente, que o fungo pode estar consumindo carboidratos, alterando o processo de partição do carbono e, dessa forma, diminuindo o potencial fotossintético nessas plantas. As plantas axênicas de milho apresentaram maiores taxas fotossintéticas quando comparadas com as plantas inoculadas e maior conteúdo de carboidratos, principalmente sacarose. As plantas controle apresentaram o mesmo comportamento das axênicas porém com menores conteúdos de carboidratos totais e sacarose.

A fotossíntese e a respiração constituem funções básicas da planta e o balanço entre estes dois processos está diretamente relacionado com o estado geral da planta. A diminuição da fotossíntese acompanhada de um aumento na respiração em plantas infectadas por patógenos (Hutcheson & Buchanan, 1983; Leite & Pascholati, 1995) está ligada ao metabolismo de carboidratos para a produção da energia necessária para ativar os mecanismos de defesa da planta. A Figura 7 mostra que a taxa de respiração no escuro das plantas de milho inoculadas foi maior do que nas plantas axênicas e controle. As plantas axênicas apresentaram uma menor taxa respiratória tanto em milho quanto em banana (Figura 6). Dessa forma, os menores conteúdos de carboidratos totais apresentados pelas plantas de milho inoculadas

poderiam estar relacionadas com o aumento da respiração nestes tecidos devido ao elevado consumo destes no processo respiratório. O menor conteúdo de carboidratos totais no tecido foliar das plantas inoculadas é mais uma indicação do efeito da presença de fungos no metabolismo da planta hospedeira, que consequentemente diminui o potencial fotossintético nessas plantas. Segundo Leite & Pascholati (1995), a respiração de um hospedeiro infectado aumenta porque os tecidos afetados passam a utilizar suas reservas de carboidratos ou seja, a planta aumenta a atividade metabólica e muita energia faz-se necessária para suprir a demanda. Ao mesmo tempo a biossíntese e o acúmulo de diversos compostos é iniciada, sendo que alguns destes estão diretamente ligados aos mecanismos de defesa.

Uma outra explicação para os menores conteúdos de carboidratos totais encontrados em folhas de plantas de milho inoculadas se refere à competição por carboidratos entre a planta e o fungo. Partindo-se da premissa de que os fungos endofíticos existem estritamente no tecido intercelular das plantas e, dessa forma tem que obter todos os seus nutrientes do tecido apoplástico do hospedeiro, a compreensão do mecanismo de troca de carboidratos entre o fungo e a planta é muito importante. Os fungos endofíticos crescem predominantemente em tecidos dreno da planta, como bainha foliar e medula, que são regiões ricas em carboidratos à partir do floema (Hinton & Bacon, 1985). A possibilidade de competição por nutrientes entre endofíticos e hospedeiros tem sido investigada por muitos autores (Smith et al., 1985; Cheplick et al., 1989; Lam et al., 1994). White Jr. et al. (1993) observaram que a habilidade dos fungos endofíticos em utilizar o açúcar disponível no meristema das plantas durante o florescimento, promovia o rápido crescimento destes e subsequente indução de doença.

Smith et al. (1984) afirmam que a conversão de carboidratos produzidos pela fotossíntese em hospedeiros, para carboidratos do fungo, tem sido considerado o processo central do desenvolvimento de doenças causadas por fungos. Os mesmos autores verificaram que as folhas de plantas de “bahiagrass” (*Paspalum notatum* Flugge), infectadas com o fungo *Myriogenospora atramentosa* (Berk. & Curt.), apresentaram menos de 4% do valor de sacarose observado em plantas não infectadas e afirmam que as plantas infectadas possuem estes valores baixos de sacarose devido a transformação desse açúcar em grandes quantidades de arabitol e manitol, que as plantas são incapazes de metabolizar. Os autores não encontraram nenhum traço de arabitol e manitol nas plantas não infectadas.

Lam et al. (1994), foram os primeiros a relatar a ocorrência de uma invertase de parede celular produzida por *Acremonium typhinum* em *Festuca rubra* L. e descreveram dois mecanismos de absorção de sacarose pelo fungo. O primeiro, se refere à existência do mecanismo de transporte mediado por carreadores e o segundo se refere à transformação da sacarose em hexoses (glicose+frutose) que são absorvidas pelo fungo antes de serem transportadas para o interior das células do tecido hospedeiro. A transformação da sacarose em hexoses é feita por invertases produzidas pela parede celular dos fungos. Dessa forma, no caso das plantas aqui analisadas, os valores de sacarose em plantas inoculadas podem ser menores devido à hidrólise desses açúcares à açúcares menores através de compostos produzidos pelo fungo.

Em corroboração com tal fato, Scholes et al. (1994) estudando as mudanças no metabolismo fotossintético e de carboidratos em plantas de cevada com fungos causadores de míldio, observaram que, as plantas infectadas apresentaram elevada atividade de invertase, que levou a um

aumento da hidrólise da sacarose à glicose e frutose. A alta concentração de carboidratos resultante da atividade de invertase causou direta ou indiretamente uma gradual retroinibição do ciclo de Calvin, levando à uma inibição da fotossíntese. Estudos recentes com plantas de tabaco transformadas para expressar uma invertase de levedura têm mostrado que, o acúmulo de carboidratos resultante da ação da invertase promoveu uma diminuição da fotossíntese e acentuou a respiração como resultado da retroinibição das enzimas do ciclo de Calvin e do aumento da atividade das enzimas glicolíticas (Stitt et al., 1990; von Schaewen et al., 1990).

Scholes et al. (1994) afirmam que a consequência do acúmulo de carboidratos sobre a taxa fotossintética é dependente de sua localização na célula. Se estes carboidratos são predominantes no apoplasto, vacúolo e em células epidérmicas, a fotossíntese pode não ser afetada em curto tempo. Se, todavia, eles se acumulam no citosol, a fotossíntese pode ser diminuída como resultado da inibição pelo produto final (via limitação de P_i) ou por um longo período de tempo por decréscimo da síntese de enzimas fotossintéticas. Em condições ambientais de CO_2 e saturação de luz, a fotossíntese é determinada em grande parte pela Rubisco (Stitt et al. 1991), enquanto em condições de saturação de CO_2 e luz ela é principalmente determinada pela taxa de síntese de produto final (limitação por P_i) (Stitt & Quick, 1989).

Whipps & Lewis (1981) sugeriram que, em plantas com metabolismo C_3 , a introdução de um fungo dentro da folha pode ser esperada por “mimetizar” o efeito de deficiência de P_i desde que os patógenos biotróficos atuam como um dreno de P_i , absorvendo e sintetizando grandes conteúdos de polifosfato dentro do micélio. Isto pode reduzir a concentração de P_i no citosol do hospedeiro e desta forma

o Pi cloroplástico, causando uma redução na taxa fotossintética e um aumento na deposição de amido. Herold et al. (1980) observou que folhas de várias plantas acumulavam grandes conteúdos de amido quando cresciam em meio deficiente de Pi.

A Tabela 4 mostra os conteúdos de PEP (fosfoenolpiruvato), PIR (piruvato) e PGA (ácido 3-fosfoglicérico) encontrados em plantas de milho axênicas, controle e inoculadas com *Fusarium moniliforme*.

Os valores de PGA das plantas controle e axênicas são semelhantes e bastante inferiores aos valores das plantas inoculadas (810 nmol .mg⁻¹ de clorofila). As plantas controle apresentaram valores de PIR e PEP inferiores aos valores observados em plantas axênicas e inoculadas.

Tabela 4: Conteúdo de PGA, PIR e PEP (nmol. mg⁻¹ de clorofila) em plantas de milho. Os dados representam uma média de 5 plantas axênicas, 5 plantas controle e 5 plantas inoculadas com *Fusarium moniliforme* $\pm$ o desvio padrão.

Plantas	PGA	PIR	PEP
Inoculadas	810 $\pm$ 168	1070 $\pm$ 182	401 $\pm$ 85
Axênicas	588 $\pm$ 58	1694 $\pm$ 318	739 $\pm$ 143
Controle	572 $\pm$ 107	470 $\pm$ 83	184 $\pm$ 51

Os valores de PGA estão dentro dos valores encontrados para plantas de milho à altas intensidades luminosas e 0,03% de CO₂ de

acordo com Usuda (1987) e Leegood & von Caemmerer (1989). De acordo com os mesmos autores, os valores de PEP e PIR estão acima dos valores esperados em plantas de milho, exceto para os valores de PIR e PEP encontrados em plantas controle que estão dentro dos valores considerados normais.

Usuda (1987) sugere a existência de uma relação positiva entre PGA e PEP, onde uma elevada concentração de PGA pode aumentar a entrada de carbono no ciclo C_4 através da conversão de PGA à PEP e consequentemente o nível total de intermediários do ciclo C_4 (malato, aspartato, PIR, PEP e alanina) pode ser aumentado, porém afirma que a compreensão sobre a regulação da partição de PGA a PEP e de PGA a DHAP para a regeneração de RUBP e síntese de sacarose ainda são necessários. Assim, a elevada capacidade fotossintética das plantas axênicas estaria gerando um grande fluxo de ATP e NADPH, que seriam ou utilizados no ciclo de Calvin produzindo grande conteúdo de sacarose ou formando PEP e elevando assim o conteúdo de intermediários do ciclo C_4 . Pode-se observar pela Tabela 4 que as plantas axênicas apresentaram grandes conteúdos de PEP e PIR.

O nível de PIR aumenta com o aumento da intensidade de luz e enquanto a taxa de fotossíntese se eleva (Usuda, 1987). Assim, os maiores valores de PIR apresentados pelas plantas axênicas (1694 nmol.mg^{-1} de clorofila) são necessários para a regeneração do PEP, que também apresentou valores elevados (739 nmol.mg^{-1} de clorofila), promovendo a fixação do CO_2 em OAA (ácido oxaloacético) e consequentemente, elevadas taxas fotossintéticas nestas plantas.

O elevado conteúdo de PIR das plantas de milho inoculadas pode ser induzido pela presença do fungo causando alterações na atividade da enzima Piruvato P-diquinase. Esta enzima atua no estroma

dos cloroplastos do mesófilo onde sua atividade depende da relação PIR/PEP e de adenilados ATP/ADP+AMP. A enzima Piruvato P-diquinase promove a fosforilação de PIR a PEP se houver disponibilidade de ATP e faz o deslocamento de PEP a PIR na ausência de ATP. Assim, a baixa disponibilidade de ATP nas plantas inoculadas pode estar favorecendo a transformação de PEP a PIR, justificando o elevado conteúdo desse metabólito (PIR) nas plantas inoculadas ($1070 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de clorofila) quando comparado com as plantas controle (470 nmol.mg^{-1} de clorofila).

A perda de atividade e conteúdo de proteínas fotossintéticas, particularmente Rubisco, tem sido reportada em sistemas de interação patógeno-hospedeiro (Roberts & Walters, 1988). Segundo Ranty et al. (1987), Roby et al. (1988) e Higgins et al. (1985), após a infecção de folhas de melão com *Colletotrichum lagenarium* e cevada com *Erysiphe graminis* houve uma redução progressiva nos mRNAs do hospedeiro que codificam as subunidades maior e menor da Rubisco. Estudos têm mostrado que a atividade transcricional de promotores de sete genes fotossintéticos em milho (incluindo a subunidade menor da Rubisco) foi reprimida pelos produtos finais da fotossíntese, sacarose e glucose (Sheen, 1990).

Scholes et al. (1994), observaram que as folhas de cevada infectadas com fungos causadores de mildio apresentaram um declínio na atividade de Fru-1,6BPase, Rubisco e NADP-GAPdh. Segundo os autores, as mudanças na atividade destas enzimas são consistentes com as mudanças nas taxas de alguns metabólitos do Ciclo de Calvin. Com o progresso da infecção houve aumento na taxa de carboxilação da Ru1,5BP (Ru1,5BP/PGA) e sua regeneração (TP/Ru1,5BP) onde o primeiro (carboxilação) é consistente com decréscimo na atividade da

Rubisco e o segundo (regeneração) é consistente com o decréscimo da ativação da Fru-1,6BPase.

Em condições de campo, vários autores (Latch & Crhistensen, 1985; Clay, 1987; Carroll, 1988; Clement et al. 1990 e White Jr. & Cole, 1985) relataram a superioridade de plantas infectadas por fungos endofíticos, quando comparadas com as demais, no que se refere aos aspectos de área foliar, resistência à pragas, doenças e a condições de estresse, precocidade de produção, entre outros. O comportamento apresentado pelas plantas inoculadas com fungos endofíticos, nas condições de cultivo descritas, difere dos relatados na literatura. Isto sugere que inicialmente as plantas infectadas sofrem muito com a infecção. Entretanto, são necessários mais experimentos para saber se este quadro pode ser revertido após um período mais longo de transplântio.

4.2.3 Fluorescência da Clorofila

A compreensão dos componentes que diminuem a fluorescência da clorofila fornecem importantes informações sobre o estado funcional do aparato fotossintético e mais especificamente sobre a eficiência do PSII (Krause & Weis, 1991).

A Figura 8A mostra a variação no estado de oxidação da Q_A (q_p), ou seja, a proporção de fótons capturados que são convertidos em energia química nos centros de reação do PSII, em plantas de milho axênicas, inoculadas e plantas controle. À medida que aumenta a intensidade luminosa, há uma diminuição progressiva do q_p , ou seja,

Figura 8: Parâmetros de fluorescência em folhas de milho. **A**- q_P (“quenching” fotoquímico) e **B**- q_N (“quenching” não fotoquímico). Os dados representam uma média de 6 plantas axênicas ($\blacktriangledown$), 8 plantas controle ($\bullet$) e 7 plantas inoculadas (∇) com *Fusarium moniliforme*.

ocorre aumento no estado de redução da Quinona A (Q_A), nas plantas axênicas e controle, sendo os valores de q_P menores para estas últimas. As plantas inoculadas apresentaram uma diminuição do q_P até cerca de $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a partir desse ponto estabilizaram.

Os fenômenos de “quenching” são fortemente influenciados por estresses ambientais (Krause & Weis, 1991). A presença do fungo ou a produção de toxinas por este, pode estar provocando algum efeito na transferência de energia entre o LHCII e o PSII com o aumento da intensidade luminosa. Assim, o menor estado de redução do “pool” de Q_A das plantas inoculadas se deve à impossibilidade de transporte de elétrons do PSII para a Q_A .

A Figura 8B mostra as variações do componente não fotoquímico (q_N) nas plantas axênicas, inoculadas e controle. Os valores de q_N foram maiores para plantas inoculadas, seguido das plantas controle e por fim as plantas axênicas que apresentaram valores menores de q_N , à medida que a intensidade luminosa foi elevada. No caso de algum impedimento na fixação de CO_2 , ocorre um aumento no estado de energização das membranas do tilacóide, e portanto aumento de q_N , aumentando o ΔpH entre o lúmen do tilacóide e o estroma, diminuindo a síntese de ATP. Segundo Krause & Weis (1991), o mecanismo de “quenching” não fotoquímico (q_N), funciona como controle e desativação inofensiva de pigmentos excessivamente excitados, servindo de função protetora contra os efeitos adversos da alta luz. Tem sido experimentalmente provado que, em presença de um elevado q_N , a fotoinibição é diminuída (Krause & Weis, 1991). O elevado q_N observado nas plantas inoculadas pode sugerir tal mecanismo de defesa aos efeitos adversos do fungo.

Figura 9: Parâmetros de fluorescência em folhas de milho. **A**- F'_M/F'_V (eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação do PSII em plantas adaptadas na luz) e **B**- Φ_{PSII} (eficiência quântica das reações fotoquímicas). Os dados representam uma média de 6 plantas axênicas ($\blacktriangledown$), 8 plantas controle ($\bullet$) e 7 plantas inoculadas (∇) com *Fusarium moniliforme*.

A Figura 9A mostra ainda os valores de F'_M/F'_V para as plantas de milho. Nele observa-se que praticamente não existem diferenças entre plantas axênicas e plantas controle à medida que se aumenta a intensidade luminosa. Porém, as plantas inoculadas de milho apresentaram uma queda mais acentuada de F'_M/F'_V à medida que se elevou a intensidade luminosa. Os valores de F'_M/F'_V indicam a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação do PSII em folhas adaptadas na luz. Assim, com o aumento da intensidade luminosa a eficiência de captura de luz pelos centros de reação do PSII cai progressivamente. Valores de F'_M/F'_V indicam ainda a extensão do processo fotoinibitório assim, quanto menores os valores de F'_M/F'_V maior a fotoinibição. Os menores valores de F'_M/F'_V para plantas inoculadas, mesmo à baixas intensidades luminosas mostram que estas plantas estão sofrendo com a presença do fungo e, podem justificar os menores valores de assimilação de CO_2 apresentado por estas plantas.

Observa-se na figura 9B os valores de ϕ_{PSII} , que refletem a eficiência quântica do transporte linear de elétrons no PSII, isto é, a eficiência de transporte de elétrons no PSII por quanta de luz absorvida pelo PSII. Nele, observa-se que as plantas axênicas apresentaram uma maior eficiência quântica do PSII (ϕ_{PSII}) até aproximadamente $900 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o que poderia justificar a maior capacidade fotossintética apresentada por estas plantas quando comparadas com as inoculadas. Até cerca de $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, os resultados mostram pouca variação nos valores de ϕ_{PSII} entre plantas inoculadas e controle. Segundo Genty et al. (1989) os valores de ϕ_{PSII} (também chamado de $\Delta\phi F/\phi F_M$) são usados rotineiramente para estimar mudanças na produção quântica do transporte de elétrons não-cíclico. Segundo os mesmos autores, tem sido

sugerido que elevado q_N produz uma redução nos valores de F'_M/F'_V e, pode justificar a relação não linear entre q_P e a produção quântica do transporte de elétrons não-cíclico. Dessa forma, semelhantes valores de ϕ_{PSII} encontrados para as plantas controle e inoculadas se devem ao elevado q_N apresentado pelas primeiras, diminuindo F'_M/F'_V e consequentemente diminuindo ϕ_{PSII} ($\phi_{PSII} = q_P \times F'_M/F'_V$) e também pelo elevado q_P apresentado pelas plantas inoculadas, que elevou os valores de ϕ_{PSII} das plantas inoculadas.

Atráves dos parâmetros de fluorescência estudados, fica claro que as plantas de milho inoculadas com o fungo endofítico *Fusarium moniliforme* estão sofrendo com a infecção e que, os valores de fluorescência apresentados por estas plantas estão de acordo com as menores taxas de fotossíntese desenvolvidas pelas plantas inoculadas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pôde-se concluir que:

1. Existem diferenças na capacidade fotossintética em função do aumento da intensidade de luz entre plantas axênicas e inoculadas, sendo que as primeiras apresentaram uma taxa fotossintética maior. Estes resultados se repetiram tanto para a banana quanto para o milho.
2. Plantas inoculadas tanto de banana quanto de milho, apresentaram menor conteúdo de clorofila quando comparadas com as plantas axênicas e controle;
3. Os valores de ϕ_p^{open} menores encontrados para as plantas inoculadas de banana, mostram que estas plantas estão sofrendo algum tipo de estresse, provavelmente devido à presença do fungo;
4. Os parâmetros de fluorescência apresentados pelas plantas inoculadas de milho, quando comparados com as plantas controle e axênicas, evidenciaram que a presença do fungo pode estar causando

algum efeito na transferência de energia entre o LHCII e o PSII, diminuindo a taxa fotossintética nessas plantas;

5. Plantas de milho inoculadas apresentaram maior conteúdo de PGA quando comparadas com o material axênico e controle. Os valores de PEP e PIR das plantas axênicas e inoculadas foram superiores aos das plantas controle. As alterações no conteúdo de metabólitos das plantas inoculadas sugerem mudanças na atividade de enzimas do ciclo de Calvin possivelmente induzidas pela presença do fungo;

6. Plantas inoculadas não apresentaram diferenças na partição do carbono, com conteúdo ligeiramente maior de amido em relação à sacarose. Plantas axênicas e controle mostraram total predomínio da síntese de sacarose;

7. O conteúdo de carboidratos totais apresentado pelas plantas inoculadas foi cerca de três vezes maior que o das plantas axênicas e aproximadamente o dobro do conteúdo de carboidratos totais presente no material controle;

8. A taxa de respiração das plantas inoculadas foi maior do que no material controle e axênico. Isto sugere que o menor conteúdo de carboidratos totais presentes nessas plantas pode estar associado ao elevado consumo destes no processo respiratório e, conseqüentemente, diminuição da taxa fotossintética nessas plantas;

9. 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;

10. Os efeitos negativos observados nas plantas inoculadas podem estar associados à fase de desenvolvimento da planta. Dessa forma, com o crescimento da planta os efeitos negativos do fungo poderiam ser revertidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J. H.; HECHT, E. P.; BASHIRIAN, S. Association between the fungus *Acremonium curvulum* and Eurasian water milfoil, *Myriophyllum spicatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, p. 1216-21, 1985.
- ARACHEVALETA, M.; BACON, C. W.; HOVELAND, C. S.; RADCLIFFE, D. E. Effect of tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, p. 83-90, 1989.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 14, n.1, p. 1-15, 1949
- AYRES, P. C. Stomatal behavior in mildewed peas: Solute potential of the epidermis and effects of pisatin. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 17, p. 147-65, 1980.
- BACON, C. W.; PORTER, J. K.; ROBBINS, J.D.; LUTTRELL, E.S. *Epichloe typhina* from toxic fescue grasses. **Applied. Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 34, p. 576-581. 1977.
- BELESKY, D. P.; DEVINE, O. J.; PALLOS, J. E.; Jr., STRINGER, W. C. Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a

fungus endophyte. **Photosynthetica**, Tchechoslovaquia, v. 21, p. 82-87. 1987.

BILGER, W. & SCHREIBER, U. Energy dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 10, p. 303-308, 1986.

BUSCHMANN, C. Variation of the quenching of chlorophyll fluorescence under different intensities of the actinic light in wildtype plants of tobacco and in an aurea mutant deficient of light-harvesting-complex. **Journal Plant Physiology**. Germany, v. 145, p. 245-252, 1995.

BUTLER, W. L. & KITAJIMA, M. Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 376, p.116-125, July. 1989.

CABRAL, D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*: dynamics of fungal populations. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 85, p. 501-11, 1985.

CAEMMERER, S. von & FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, Berlin, v. 153, p. 376-387, 1981.

CARROLL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J. & HEUVEL, J. van den., ed. **Microbiology of Phyllosphere**. London, Cambridge University Press, 1986. p. 205-22.

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

- CARROLL G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, p. 3034-3043. 1978.
- CHEPLICH, G. P.; CLAY, K.; MARCKS, S. Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinaceae*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 111, p. 89-97. 1989.
- CLAY, K. Induced vivipary in the sedge *Cyperus virens* and the transmission of the fungus *Balansia cyperi* (Clavicipitaceae). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 64, p. 2984-88, 1986.
- CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia**, Berlin, v. 73, p. 358-362, 1987.
- CLAY, K. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. In: PIROZYNSKI, K.A. & HAWKSWORTH, D.L., ed. **Coevolution of Fungi with Plants and Animals**. London, Academic Press, 1988. p. 79-105.
- CLAY, K. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, p. 1-12, 1989.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review Ecology System**. Palo Alto, v. 21; p. 275-97, 1990. .
- CLEMENT, S. L.; PIKE, K. S.; KAISER, W. J.; WILSON, A. D. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and

perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae). **Journal of the Kansas Entomology Society**. Manhattan, v. 63, n. 4, p. 646-48. 1990.

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

GENTY, B.; BRIANTIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 990, p. 87-92, 1989.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of infectious plant disease**. Columbia, University of Missouri Press, 1986. 433 p.

HAMER, J. E.; HOWARD, R. J.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science**, Washington, v.239, p. 288-90, 1988.

HAVAUX, M. Stress tolerance of photosystem II *in vivo*: antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stresses. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 100, p. 424-432, 1992.

HAVAUX, M. Temperature-dependent modulation of the photoinhibition-sensitivity of photosystem II in *Solanum tuberosum* leaves. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 35, n. 5, p. 757-66, 1994.

HEROLD, A.; MCGEE, E. E. M.; LEWIS, D. H. Effect of orthophosphate concentration and exogenously supplied sugars on the distribution of newly fixed carbon in sugar beet leaf discs. **New Phytologist**, Cambridge, v. 85, p. 1-13, 1980.

- HIGGINS, C. M.; MANNERS, J. M.; SCOTT, K. J. Decrease in three messenger RNA species coding for chloroplast proteins in leaves of barley infected with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 78, p. 891-894. 1985.
- HINTON, D. M.; BACON, C. W. The distribution and ultrastructure of the endophyte of toxic tall fescue. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, p. 36-42. 1985.
- HUTCHESON, S. W. & BUCHANAN, B. Bioenergetic and metabolic disturbances in diseased plants. In: CALLOW, J. A. (ed.). **Biochemical Plant Pathology**. Chichester, John Wiley, 1983. p. 327-345.
- JOHNSON, J. A.; WHITNEY, N. J. A study of fungal endophytes of needle of balsam fir (*Abies balsamea*) and red spruce (*Picea rubens*) in New Brunswick, Canada, using culture and electron microscope techniques. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, p. 3513-6, 1989.
- KATZ, B.; LICHT, H. H. Fungi associated with loblolly pine needles. II. Phenology and vertical distribution of fungi in the canopy and first year litter. **International Journal of Biometeorology**, New York, v. 24, p. 179-197. 1980.
- KENAGA, C. B. **Principles of Phytopathology**. Lafaiette, Balt Publishers, 1974. 402 p.
- KITAJIMA, M. & BUTLER, W. L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry by dibromothymoquinone. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 376, p. 105-115, 1975.

- KOOTEN, O. van & SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 25, p. 147-50, 1990.
- KRAUSE, G. H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313-49, 1991.
- LAM, C. K.; BELANGER, F. C.; WHITE Jr., J. F.; DAIE, J. Mechanism and rate of sugar uptake by *Acremonium typhinum*, and endophytic fungus infecting *Festuca rubra*: evidence for presence of a cell wall invertase in endophytic fungi. **Mycologia**, Amherst, v. 86, n. 3, p. 408-415, 1994.
- LATCH, G. C. M. & CHRISTENSEN, M. J. Artificial infection of grasses with endophytes. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 107, p.17-24, 1985.
- LATCH, G. C. M.; HUNT, W. F. MUSGRAVE, D. R. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 28, p. 165-168. 1985.
- LEEGOOD, R. C. & CAEMMERER, S. von. Some relationship between contents of photosynthetic metabolites and the rate of photosynthetic carbon assimilation in leaves of *Zea mays* L. **Planta**, Berlin , v. 178, p. 258-66, 1989.
- LEEGOOD, R. C. & FURBANK, R. T. Stimulation of photosynthesis by 2% O₂ at low temperatures is restored by phosphate. **Planta**, Berlin, v. 168, p. 84-93, 1986.

- LEEGOOD, R. C.; LABATE, C. A.; HUBER, S. C.; NEUHAUS, H. E.; STITT, M. Phosphate sequestration by glycerol and its effects on photosynthetic carbon assimilation by leaves. **Planta**, Berlin, v. 176, p. 117-126, 1988.
- LEEGOOD, R. C. & SCHOLLES, J. D. Metabolic changes following infection of leaves by fungi and viruses. In: GURR, S. J.; McPHERSON, M. J.; BOWLES, D. J. (ed.). **Molecular Plant Pathology**: A practical approach. Oxford, Oxford University Press, 1991, v. II, p.223-232.
- LEITE, B. & PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In : BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.). **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 1995, v.1, p. 393-416.
- LINDSTROM, J. T. & BELANGER, F. C. Purification and characterization of an endophytic fungal proteinase that is abundantly expressed in the infected host grass. **Plant Physiology**, Bethesda, v.106, p. 7-16, 1994.
- LINDSTROM, J. T.; SUICHANG, S.; BELANGER, F. C. A novel fungal protease expressed in endophytic infection of *Poa* species. **Plant Physiology**, Bethesda, v.102, p. 645-50, 1993.
- LONG, S. P. & HÄLLGREN, J. E. Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and laboratory. In: COOMBS, J.; HALL, D. O.; LONG, S. P.; SCURLOCK, J. M. O. (ed.). **Techniques in bioproductivity and photosynthesis**. Oxford, Pergamon Press, 1985, p. 62-94.
- LOWRY, O. & PASSONNEAU, J. V. **A flexible system of enzymatic analysis**. Academic Press, New York, 1972.

- MATTA, A. Microbial penetration and immunization of uncongenial host plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 185-209, 1971.
- PAMPHILE, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. Isolamento e caracterização molecular por RAPD de linhagens endofíticas de *Fusarium* sp. isoladas de milho. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20, Piracicaba-S.P., 1995. **Anais** ESALQ/USP-Piracicaba, 1995, p. 122.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PEREIRA, J.O. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. Piracicaba, 1993. 105p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J. & HEUVEL, J. van den., ed. **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1986. p. 157-87.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S., ed. **Microbial ecology of leaves**. Spring Verlag, 1991. p. 179-97.
- PETRINI, O.; STONE, J.K.; CARROL, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, p. 789-96, 1982.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HERMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of

Aspergillus nidulans. **Advances in Genetics**, New York, v. 5, p. 141-238, 1953.

PORTER, J. K.; BACON, C. W.; CUTLER, H. G.; ARRENDALÉ, R. F.; ROBBINS, J. D. In vitro auxin production by *Balansia epichlœ*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 24, p. 1429-31, 1985.

PORTER, J. K.; ROBBINS, J. D.; HIMMELSBACH, D. S.; HIGMAN, H. C. Indole alkaloids from *Balansia epichlœ* (Weese). **Journal of Agronomy and Food Chemistry**, Whashington, v. 25, p. 88-93, 1977.

QUICK, W. P. & STITT, M. An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 977, p. 287-296, 1989.

RAGGI, V. CO₂ Assimilation, respiration and chlorophyll fluorescence in peach leaves infected by *Taphrina deformans*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, p. 540-544, 1995.

RANTY, B.; ROBY, D.; CAVALIE, G.; ESQUERRE-TUGAYE, M. T. Ribulose-1,5-bisphosphatase carboxilase/oxygenase expression in melon plants infected with *Colletotrichum lagenarium*. **Planta**, Berlin, v. 170, p. 386-391. 1987.

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

RICE, J. S., PINKERTON, B.W.; STRINGER, W. C.; UNDERSNDER, D. J. Seed production in tall fescue as

affected by fungal endophyte. **Crop Science**, Madison, v. 30, p. 1303-05, 1990.

ROBERTS, A. M. & WALTERS, D. R. Photosynthesis in discrete regions of leek infected with the rust, *Puccinia allii* Rud. **New Phytologist**, Cambridge, v. 110, p. 371-376, 1988.

ROBY, D.; MARCO, Y.; ESQUERRE-TUGAYE, M. T. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene expression in melon plants infected with *Colletotrichum lagenarium*. Activity level and rate of synthesis of mRNAs coding for the large and small subunits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 32, p. 411-24, 1988.

SCHAEWEN, A. von; STITT, M.; SCHMITT, R.; SONNEWALD, V.; WILLMITZER, L. Expression of yeast derived invertase in the cell wall tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 9, p. 3033-3044, 1990.

SCHOLES, J. D.; LEE, P. J.; HORTON, P.; LEWIS, D. H. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, p. 213-222, 1994.

SCHREIBER, U.; SCHIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 10, p. 51-62, 1986.

- SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; J-AUST, H. Endophytes from herbaceous plants and Shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 12, p. 1447-50, 1993.
- SHEEN, J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 1027-1038, 1990.
- SHERWOOD-PIKE, M., STONE, J. K.; CARROLL, G. C. *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas-fir. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 64, p. 1849-1855, 1986.
- SIEGEL, M. R.; LATCH, G. C. M.; JOHNSON, M. C. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 293-315. 1987.
- SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Diseases**, St. Paul, v. 75, p. 220-224. 1991.
- SMITH, K. T. ; BACON, C. W.; LUTTRELL, E. S. Reciprocal translocation of carbohydrates between host and fungus in bahiagrass infected with *Myriogenospora atramentosa*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 75, p. 704-11, 1985.
- STITT, M. & QUICK, W. P. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 77, p. 633-41, 1989.
- STITT, M.; QUICK, W. P.; SCHURR, U.; SCHULTZE, E. D.; RODERMEL, S. R.; BOGORAD, L. Decreased Rubisco in tobacco transformed with antisense rbcs. II. Flux control coefficients in varying light, CO₂, and air humidity. **Planta**, Berlin, v. 183, p. 555-66, 1991.

- STITT, M.; von SCHAEWEN, A.; WILLMITZER, L. 'Sink' regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a down-regulation of the Calvin cycle and an up-regulation of glycolysis. **Planta**, Berlin, v. 183, p. 40-50, 1990.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. **CAB International Oxford**, cap. 1, p. 1-26, 1993.
- TOTI, L.; VIRET, O.; CHAPELA, I. H.; PETRINI, O. Differential attachment by conidia of the endophyte, *Discula umbrinella* (Berk. & Br.) Morelet, to host and non-host surfaces. **New Phytologist**, Cambridge, v. 121, p. 469-75, 1992.
- USUDA, H. Changes in levels of intermediates of the C₄ cycle and reductive pentose phosphate pathway under various light intensities in maize leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, p. 549-554, 1987(b).
- VERNON, L. P. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. **Anal. Chemical**, New York, v.32, p. 1144-50, 1960.
- WALLNER, B. M.; BOOTH, N. H.; ROBBINS, J. D.; BACON, C. W.; PORTER, J. K.; KAISER, T. E.; WILSON, R.; JOHNSON, B. Effect of an endophytic fungus isolated from toxic pasture grass on serum prolactin concentrations in the lactating cow. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, p. 11317-1322. 1983.
- WEST, C. P.; IZEKOR, E.; OOSTERHUIS, D. M.; ROBBINS, R. T. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 112, p. 3-6, 1988.

- WEST, C. P.; OOSTERHUIS, D. M.; WULLSCHLENGER, S. D.
Osmotic adjustment in tissues of tall fescue in response to water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 30, p. 149-156, 1990.
- WHIPPS, J. M.; LEWIS, D. H. Patterns of translocation, storage and interconversion of carbohydrate. In: AYRES, P. G. (ed.). **Effects of disease on the physiology of the growing plant**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981, p. 47-84.
- WHITE Jr., J. F. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. **Mycologia**. Lancaster, v. 80, p. 442-46, 1988.
- WHITE Jr., J. F.; BREEN, J. P.; MORGAN-JONES, G. Substrate utilization in selected *Acremonium*, *Atkinsonella* and *Balansia* species. **Mycologia**, Lancaster, v. 83, p. 601-610, 1991.
- WHITE Jr., J.F. & COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, Lancaster, v. 77, p. 323-7, 1985.
- WHITE Jr., J.F. & COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. V. Occurrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. **Mycologia**, Lancaster, v. 78, n. 5, p. 846-50, 1986.
- WHITE Jr., J. F. & MORGAN-JONES, G. Endophyte-host associations in forage grasses. IX. Concerning *Acremonium thypinum*, the anamorph of *Epichle typhina*. **Mycotaxon**. Ithaca, v. 29, p. 489-500, 1987.

WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A. C.
Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of
Acremonium endophytes. **Agricultural Ecosystem &
Environment**, Amsterdam, v. 44, p. 13-37, 1993.

WILSON, A. D.; CLEMENTE, S. L.; KAISER, W. J. Survey and
detection of endophytic fungi in *Lolium* germ plasm by direct
staining and aphid assays. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, p.
169-73, 1991.