

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

**Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar
convencional e geneticamente modificada**

Rodrigo Makowiecky Stuart

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2006

Rodrigo Makowiecky Stuart
Biólogo

Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada

Orientador:

Prof^a. Dr^a. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2006

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

Stuart, Rodrigo Makowiecky

Comunidade de fungos endofíticos associada cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada / Rodrigo Makowiecky Stuart. - - Piracicaba, 2006.
65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Cana-de-açúcar 2. Fungos 3. Genomas 4. Marcador molecular 5. Microrganismos endofíticos I. Título

CDD 633.61

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

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos"

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Estanislau Makowiecky Filho (*in memorian*) e Margotte Blumentrit Makowiecky, e minha Mãe, Maria de Lourdes Makowiecky, pelo incentivo, apoio, educação, cuidado, amor e carinho.

À Karen, minha namorada, pela amizade de todos os dias, pela compreensão nos momentos difíceis, pela preocupação, alegria, carinho e amor.

À professora Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, ao professor João Lúcio de Azevedo e ao professor Welington Luiz Araújo, pela amizade, confiança e orientação.

À professora Ida Chapaval Pimentel da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos e amizade.

A CAPES pela bolsa de estudos.

Ao Centro de Tecnologia Canaveira, em especial ao Dr. Eugênio César Ulian e Dra. Sabrina Moutinho Chabregas, por fornecerem as variedades de cana-de-açúcar e o sítio experimental utilizado neste trabalho.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” por disponibilizar o seqüenciador utilizado neste trabalho.

Aos amigos do laboratório, Ademir Durrer, Aldo Procópio, Aline Romão (Romã), Alessandro Riffel (Gaúcho velho), Anderson Ferreira (Gaúcho novo), Cláudia Gai, Danice Luvizotto (Metal), Denise Moedin Balani, Fernanda Souza (Fer), Fernanda Bueno (Fer-SP) Fernando Andreote (Moska – na Holanda), Francisco Andreote (Fran), Joelma Marcon (Jô), Léa Fávaro, Manuela Nóbrega (Manu), Marize Suzuki, Maria Beatriz Calderan (Bia), Maria Carolina Quecine (Carol), Michelle Pereira e Silva, Priscila Rossetto (Pri), Rodrigo Mendes (Xico – na Holanda), Paulo Lacava (Lacava), Antônio José da Silva (Zezo), pela compreensão, alegria, brincadeiras e discussões essenciais para a elaboração deste trabalho.

A todos os amigos do Departamento de Genética e do curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

A Giovana e Célia, secretárias da pós-graduação em Microbiologia Agrícola, por toda a ajuda e amizade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho e que por ventura tiveram seus nomes esquecidos.

Ao Perci e CIA do Circo pelos momentos de descontração essenciais para manter a mente e o corpo saudáveis (nem só de ciência vive o homem – parte 1).

À Sony Entertainment pela melhor plataforma de videogame criada até hoje (nem só de ciência vive o homem – parte 2).

À B.B. King, John Lee Hooker (*in memorian*), Eric Clapton, 10.000 Maniacs (*in memorian*), Alanis Morissette etc. por me acompanharem por todos estes anos.

Aos Egípcios por começarem os primeiros processos de fermentação e a Bohemia, que desde 1853 vem aperfeiçoando estes processos e fazendo a melhor cerveja brasileira (nem só de ciência vive o homem – parte 3).

A 1,3,7-trimetilxantina (vulgo cafeína), uma das melhores moléculas criadas pela natureza. Sem ela tudo seria mais difícil.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Fungos endofíticos.....	14
2.2 Diversidade de fungos endofíticos.....	16
2.3 A cana-de-açúcar.....	18
2.4 Plantas geneticamente modificadas.....	19
2.5 Modo de ação e tolerância aos herbicidas derivados de imidazolinonas...	20
2.6.Efeito das plantas transgênicas sobre comunidades microbianas.....	21
2.7 Variabilidade genética por ARDRA (<i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i>) e seqüenciamento do rDNA.....	23
2.8 Análise da diversidade de microrganismos utilizando técnicas independentes de cultivo.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Área de cultivo e material vegetal.....	27
3.2 Análise dependente de cultivo.....	28
3.2.1 Isolamento de fungos endofíticos.....	28
3.2.2 Extração de DNA, análise de restrição do rDNA (ARDRA) e seqüenciamento de nucleotídeos.....	28
3.2.3 Montagem dos dendrogramas e análise das seqüências.....	29
3.2.4 Análise de diversidade e análise molecular de variância (AMOVA).....	30
3.3 Análise independente de cultivo (análise metagenômica).....	31
3.3.1 Extração do DNA, amplificação e clonagem da região 18S do rDNA.....	31
3.3.2 Extração dos plasmídeos e seqüenciamento.....	32
3.3.3 Análise das seqüências.....	33
4 RESULTADOS.....	34

4.1 Análises dependentes de cultivo.....	34
4.1.1 Isolamento de fungos endofíticos de folhas de cana-de-açúcar.....	34
4.1.2 Análise de restrição do rDNA (ARDRA).....	36
4.1.3 Análise molecular de variância (AMOVA) e análise de diversidade de Shannon.....	38
4.1.4 Seqüenciamento e análise filogenética.....	40
4.2 Análise metagenômica.....	43
4.2.1 Amplificação do gene 18S, clonagem e seqüenciamento.....	43
4.2.2 Análise filogenética.....	45
5 DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada

A diversidade da comunidade endofítica de fungos associada à cana-de-açúcar transgênica tolerante a imazapyr e suas linhas de cultivo não transgênicas foi avaliada por isolamento e ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*). Cultivares transgênicos e não-transgênicos, e seu manejo (aplicação do herbicida ou remoção manual de daninhas), foram considerados para verificar o possível efeito indireto da cana-de-açúcar geneticamente modificada (GM) sobre a comunidade de fungos endofíticos. O total de quatorze haplótipos de ARDRA foram observados na comunidade endofítica de cana-de-açúcar. O seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 revelou uma comunidade rica representada por doze famílias diferentes do filo Ascomycota. Alguns dos isolados demonstraram alta similaridade com gêneros que ocorrem comumente como endófitos em plantas de clima tropical, como *Cladosporium*, *Eppicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis* e *Xylaria*. A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que as flutuações observadas na composição dos haplótipos estão relacionadas tanto ao cultivar transgênico quanto a aplicação do herbicida. Enquanto a aplicação do herbicida induziu mudanças rápidas e transientes na comunidade de fungos, as plantas transgênicas induziram mudanças mais lentas que foram mantidas ao longo do tempo. Uma abordagem independente de cultivo baseada em bibliotecas de 18S ambiental revelou a presença de clones com seqüências similares a gêneros das famílias Ustilaginaceae e Filobasidiaceae, e das ordens Sporidiobolales e Tremellales, todos do filo Basidiomycota. Os resultados aqui demonstrados representam o primeiro relato sobre a composição de fungos endofíticos associados a plantas de cana-de-açúcar e também representam um passo importante para o entendimento dos efeitos que plantas transgênicas e seu manejo podem induzir sobre a comunidade de fungos endofíticos.

Palavras-chave: Endófitos, Fungos, Plantas transgênicas, ARDRA, Biblioteca de 18S, Análise metagenômica.

ABSTRACT

Community of endophytic fungi associated with conventional and genetically modified sugarcane

The diversity of fungal endophytic community associated with transgenic imazapyr-tolerant sugarcane plants and its non-transgenic lines was evaluated by isolation and ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis). Transgenic and non-transgenic cultivars and their crop management (herbicide application or manual weed control) were considered in order to assess the possible non-target effects of genetically modified (GM) sugarcane on the fungal endophytic community. A total of fourteen ARDRA haplotypes were observed in the endophytic community of sugarcane. ITS1-5.8S-ITS2 sequencing revealed a rich community represented by twelve different families from the Ascomycota phylum. Some of the isolates showed a high sequence similarity with genera that commonly occur as endophytes in plants from tropical climates, such as *Cladosporium*, *Eppicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis* and *Xylaria*. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) indicated that fluctuations observed in haplotypes composition were related to both transgenic cultivar and herbicide application. While herbicide applications induced quickly transient changes in the fungal community, transgenic plants induced slower changes that were maintained over time. A cultivation-independent approach based on libraries of environmental 18S revealed the presence of clones with high sequence similarity with genera from Ustilaginaceae and Filobasidiaceae families and Sporidiobolales and Tremellales orders, all from Basidiomycota phylum. The results demonstrated here represent the first draft on the composition of fungal endophytes associated with sugarcane plants and also represent an important step to understand the effects that transgenic plants and their crop management may induce on fungal endophytic community.

Keywords: Endophytes, Fungi, Transgenic plants, ARDRA, 18S libraries, Metagenomic analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do cluster gênico que codifica o RNA ribossômico em fungos.....	24
Figura 2 – Esquema do delineamento experimental considerando três tratamentos e quatro repetições montados em blocos inteiramente casualizados em um total de 12 parcelas contendo cinco linhas de cana-de-açúcar.....	27
Figura 3 – Exemplos das colorações de colônias dos grupos de fungos endofíticos isolados de folhas de cana-de-açúcar.....	35
Figura 4 – Gel de agarose 2,4% com os diferentes perfis de restrição identificados para cada enzima.....	37
Figura 5 – Porcentagem de distribuição dos haplótipos de fungos endofíticos de folhas nos diferentes tratamentos de cana-de-açúcar analisados.....	37
Figura 6 – Similaridade genética entre os diferentes haplótipos de fungos endofíticos isolados de cana-de-açúcar convencional e transgênicas (tratadas ou não com herbicida) com base no coeficiente de similaridade de <i>Simple Matching</i>	38
Figura 7 – Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes e Cantor para as seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos dos 14 haplótipos encontrados pela técnica de ARDRA.....	42
Figura 8 – Produtos de PCR referentes ao gene 18S de basidiomicetos.....	44
Figura 9 – Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes e Cantor para as seqüências do gene 18S de 24 clones representativos da biblioteca metagenômica de fungos endofíticos de cana-de-açúcar.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Freqüência de colonização de fungos endofíticos.....	34
Tabela 2 –	Análise de variância molecular (AMOVA) entre os haplótipos de fungos endofíticos isolados de folhas de cana-de-açúcar.....	40
Tabela 3 –	Correlação entre as seqüências obtidas neste trabalho e seqüências do banco de dados do NCBI.....	44

1 INTRODUÇÃO

As plantas podem ser vistas como complexos e dinâmicos microecossistemas que abrigam redes de interações entre diversas comunidades microbianas. Estas interações ocorrem tanto na superfície das plantas quanto em seu interior, em um grau de associação que vai desde o mutualismo até o parasitismo (ANDREWS; HARRIS, 2000). Desta forma, destacam-se os microrganismos endofíticos – bactérias e fungos que habitam, ao menos um período de seus ciclos de vida, o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ou produzir estruturas externas (AZEVEDO et al., 2000); incluindo os microrganismos simbioses, saprófitos e patógenos latentes ou emergentes (SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004).

Os microrganismos endofíticos podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e defesa da planta hospedeira, protegendo-a do ataque de insetos através pela produção de metabólitos ativos ou pela indução de resistência na mesma (SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005). Distúrbios nas interações entre plantas e endófitos podem tanto ser oriundos de efeito natural, relacionados às condições ambientais, tipo de solo e a própria interação com outros microrganismos, quanto de efeito artificial, como a aplicação de herbicidas e pesticidas, contaminação com metais pesados, manejos culturais, e mais recentemente o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs) e os produtos de seus transgenes.

Plantas geneticamente modificadas têm sido utilizadas por diversos países com o intuito de aumentar a produtividade agrícola. Neste contexto, empresas de biotecnologia e institutos de pesquisa têm desenvolvido PGMs com diversas características, como: resistência ao herbicida glifosato (gene *cp4 epsps*), resistência à pragas (gene *cryA1*), resistência a patógenos (gene da lisozima), alto teor de vitaminas (arroz dourado) dentre outras. Embora ofereça muitos benefícios, a liberação destes produtos para plantio e consumo depende de estudos intensos sobre os impactos gerados ao homem e a natureza.

A cultura da cana-de-açúcar vem ocupando um lugar de destaque na economia brasileira. Com área plantada superior ao território de muitos países europeus, a cana-

de-açúcar ocupa 6,1 milhões de hectares, apresentando um rendimento médio de 73,5 t.ha⁻¹ (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2006). A importância dessa cultura está fundamentada na produção açucareira, responsável por grandes movimentações financeiras relacionadas e exportação, e na produção de álcool combustível devido a grande procura por fontes de energia alternativa aos combustíveis derivados de petróleo. Um dos problemas referentes ao cultivo da cana-de-açúcar é a alta incidência de plantas daninhas representando uma redução de 15% a 80% na produção total de colmos do estado de São Paulo, maior produtor nacional (BLANCO; OLIVEIRA; COLETI, 1981; CHRISTOFFOLETI, 1997). O gasto para o controle de daninhas na cultura da cana-de-açúcar corresponde a 30% do gasto total com a cultura (LORENZI, 1988), de modo que formas alternativas para o controle de daninhas vêm sendo estudadas visando principalmente à redução dos custos de produção. Uma alternativa vem sendo o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificadas para tolerância a herbicidas mais fortes, reduzindo o número de aplicações do produto. A transformação e cultivo de PGMs vêm gerando muitos debates a respeito dos possíveis efeitos indesejáveis ocasionados ao meio ambiente (HAILS, 2000).

Não existe ainda um consenso estabelecido a respeito destes efeitos sobre comunidades microbianas, de modo que, tanto efeitos neutros como negativos vem sendo reportados em periódicos especializados (KOWALCHUK; GERARDS; WOLDENDORP, 2003; DUNFIELD; GERMIDA, 2004). Alguns dos efeitos negativos incluem a invasão e dispersão das próprias plantas no ecossistema nativo causando efeitos indiretos; o fluxo do transgene através do pólen ou da transferência horizontal de genes por microrganismos; desenvolvimento de resistência em organismos alvos e efeitos em organismos não alvos; e efeitos sobre a biodiversidade de microrganismos benéficos e antagonistas (DUNFIELD; GERMIDA, 2004).

Neste contexto, o presente trabalho visou identificar as possíveis alterações na composição da comunidade de fungos endofíticos associada ao cultivo da variedade de cana-de-açúcar geneticamente modificada para resistência ao herbicida imazapyr.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos endofíticos

Todos os microrganismos que habitam o interior de um vegetal, ao menos um período de seu ciclo de vida, podem ser considerados endofíticos (AZEVEDO et al., 2000). Tais microrganismos ocupam os espaços intercelulares dos tecidos vegetais (STROBEL, 2003), sendo encontrados, de modo geral, em todos os órgãos da planta (AZEVEDO et al., 1998; AZEVEDO et al., 2000; SCHULZ; BOYLE, 2005). Esta definição pode ser aplicada não somente aos simbioses, mutualistas ou neutros, mas também aos microrganismos patogênicos latentes, inativos e emergentes (PETRINI, 1991; SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004).

A colonização dos tecidos vegetais por microrganismos endofíticos ocorre pela transferência dos microrganismos já presentes nas plantas para as gerações seguintes através dos frutos e sementes, bem como pela entrada de microrganismos do solo logo após a germinação das sementes. Plantas adultas podem ser colonizadas pela entrada dos microrganismos pelos estômatos ou por fissuras nas folhas, caules e raízes (WAGNER; LEWIS, 2000; STROBEL, 2003; SAIKKONEN et al., 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Os microrganismos endofíticos foram inicialmente descritos por Barry em 1866 (AZEVEDO et al., 1998), entretanto somente receberam a devida atenção nos últimos 20 anos, onde pesquisas demonstraram que estes, até então considerados neutros, ou seja, não causavam benefícios ou malefícios às plantas, desempenhavam um papel importante na proteção contra o ataque de doenças, insetos e animais herbívoros. Mais recentemente descobriu-se que os endófitos estariam também envolvidos no desenvolvimento das plantas, aumentando sua taxa de crescimento, enraizamento e resistência a estresses bióticos e abióticos (HALLMANN et al., 1997; SAIKKONEN et al., 1998; SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005), demonstrando assim uma íntima relação evolutiva entre plantas e microrganismos endofíticos. Segundo Strobel (2003), esta relação provavelmente

iniciou-se a aproximadamente 100 milhões de anos com o surgimento das primeiras plantas na terra.

Os organismos endofíticos destacam-se por sua importância potencial no controle natural de doenças e pragas vegetais. Fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e utilizados no controle biológico de insetos pragas na agricultura são encontrados como endófitos. Este é o caso de *Beauveria bassiana*, endófito do milho que protege o hospedeiro contra o ataque de insetos (BING; LEWIS, 1993; WAGNER; LEWIS, 2000; PIMENTEL, 2001).

Durante a evolução das plantas, associações mutualísticas com fungos endofíticos ocorreram e promoveram adaptações relacionadas à capacidade de defesa da planta contra o ataque de insetos, microrganismos e animais herbívoros, através da produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos a seus inimigos (LIU et al., 2001).

Artemisia annua, planta da família Composite, é bem conhecida por produzir um composto antifúngico denominado artemisina, que protege a planta contra fungos fitopatogênicos (LIU et al., 2001). Estes autores observaram que 21 fungos endofíticos isolados de *Artemisia annua* possuíam atividade antagônica ao crescimento dos fungos fitopatogênicos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium graminearum*, *Gerlachia nivalis* e *Phytophthora capsici*, sugerindo que a defesa da planta seria, na verdade, decorrente da presença de fungos endofíticos.

Muscodor albus, uma nova espécie de fungo endofítico isolado da planta de canela (*Cinnamomum zeilanicum*), demonstrou ser capaz de inibir e matar outros fungos e bactérias pela produção de cinco tipos diferentes de compostos metabólitos voláteis (STROBEL et al., 2001).

Os fungos endofíticos destacam-se também por seu potencial biotecnológico, sendo úteis ao homem pela produção de determinadas drogas utilizadas na medicina. Este é o exemplo do taxol, uma droga anticancerígena altamente utilizada na indústria farmacêutica e produzida pelos fungos endofíticos *Taxomyces andreanae*,

Pestalotiopsis microspora, *Periconia* sp., *Tubercularia* sp. e *Trichothecium* sp. (STROBEL, 2003).

2.2 Diversidade de fungos endofíticos

Os fungos compreendem aproximadamente 72.000 espécies descritas, entretanto a verdadeira escala de diversidade de fungos é um debate aberto e recorrente (ARNOLD et al., 2000). Estimativas iniciais consideram que os fungos ocorrem em uma proporção de seis espécies fúngicas para cada espécie vegetal, compreendendo aproximadamente 1.500.000 espécies (HAWKSWORTH, 1991).

As estimativas dos números de espécies de fungos, em sua maioria, são baseadas em regiões de clima temperado e nas frequências de colonização observados para espécies normalmente descritas, como as relacionadas a doenças em plantas e animais, e as que produzem estruturas sexuais bem aparentes. Duas falhas de amostragem neste tipo de estimativa referem-se às regiões tropicais e aos fungos endofíticos, normalmente desconsiderados (GAMBOA; LAUREANO; BAYMAN, 2002). Considerando-se a presença de fungos endofíticos e a alta diversidade associada aos climas tropicais, a proporção sugerida para o número total de espécies de fungos seria de 33 espécies fúngicas para cada espécie vegetal, compreendendo aproximadamente 8.250.000 espécies (FRÖHLICH; HYDE, 1999, ARNOLD et al., 2000; HAWKSWORTH, 2000, GAMBOA; LAUREANO; BAYMAN, 2002).

Os fungos endofíticos vêm sendo encontrados em associações com algas (HAWKSWORTH, 1988), briófitas (SCHULZ et al., 1993), pteridófitas (FISHER, 1996), coníferas (BERNSTEIN; CARROL, 1977; LEGAULT; DESSUREAULT; LAFLAMME, 1989), gramíneas (CLAY, 1988), palmeiras (RODRIGUEZ, 1994; FRÖHLICH; HYDE, 1999), arbustos (PETRINI; STONE; CARROL, 1982) e árvores em geral (FAETH; HAMMON, 1997). Dentre as espécies comumente encontradas como endofíticas destacam-se principalmente membros do filo Ascomycota (SCHULZ; BOYLE, 2005), compreendendo freqüentemente os ascomicetos que produzem ascostromas (Loculoascomicetos) e os que produzem peritécios (Pirenomicetos) (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Este é o maior filo dos fungos, com 50% de todas as

espécies conhecidas (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999). As espécies deste filo possuem micélio compartimentalizado com septos apresentando poros simples e são reconhecidas pela presença de células reprodutivas em forma de sacos, denominadas ascos, contendo ascósporos que são formados durante a reprodução sexuada (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Artificialmente os fungos endofíticos podem ser divididos em dois grupos distintos: balansiaceos e não-balansiaceos.

Os fungos balansiaceos formam um grupo único de espécies muito relacionadas que apresentam requerimentos ecológicos e adaptações distintas de todos os outros fungos endofíticos (PETRINI, 1996). Os fungos balansiaceos compreendem os gêneros de ascomicetos *Epichloë* e *Balansia* e seus anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis* (SCHULZ; BOYLE, 2005), sendo encontrados crescendo de forma sistêmica e intercelular em todos os órgãos de gramíneas, resultando na transmissão vertical através das sementes (BACON; WHITE, 2000). Seus micélios apresentam estruturas especializadas para a absorção de nutrientes (CHRISTENSEN; BENNETT; SCHMID, 2002) e muitos produzem uma variedade de metabólitos secundários (SCHULZ; BOYLE, 2005). A relação entre fungos balansiaceos e seus hospedeiros vem sendo considerada mutualista, sendo que o fungo beneficia-se com o ganho nutricional e proteção contra estresse abiótico enquanto a planta beneficia-se pela proteção contra herbivoria através da produção de alcalóides tóxicos por parte do fungo (WHITE; REDDY; BACON, 2000; SAIKKONEN et al., 1998; SAIKKONEN et al., 2004).

Os fungos endofíticos não-balansiaceos representam um grupo diverso, representado, em sua maioria, por espécies de diferentes famílias do filo Ascomycota, sendo isoladas de todos os órgãos de praticamente todas as plantas terrestres (PETRINI, 1991; SCHULZ et al., 1993; STONE; BACON; WHITE, 2000). Representantes deste grupo ocorrem momentaneamente de maneira críptica localizada ou sistêmica nos tecidos do hospedeiro (SCHULZ; BOYLE, 2005). São cosmopolitas ocorrendo em ambientes temperados e tropicais, sendo os gêneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Pleospora*, freqüentemente isolados de uma ampla gama de hospedeiros. (SCHULZ et al., 1993; FRÖHLICH; HYDE, 1999;

ARNOLD et al., 2000; AZEVEDO et al., 2000; ROGERS, 2000; ARNOLD et al., 2000; PIMENTEL, 2001; CANNON; SIMMONS, 2002; SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003; PIMENTEL et al., 2006).

2.3 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) engloba 30 espécies pertencentes à família Poaceae (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2005). Sua cultura é destaque no cenário agrícola brasileiro, sendo cultivada em vários tipos de ambientes (associação de clima e solo) (MAULE; MAZZA; MARTHA, 2001).

O cultivo da cana-de-açúcar começou no Brasil em 1522 na cidade de São Vicente e foi trazida da Ilha da Madeira por Martin Afonso de Sousa. Posteriormente, em 1533, a cana-de-açúcar foi introduzida na cidade de Pernambuco por Duarte Coelho Pereira (BASTOS, 1987). Durante o período do Brasil colonial o cultivo da cana-de-açúcar estava restrito a produção de açúcar (SZMRECSANYI; MOREIRA, 1991). Entretanto, o crescimento da importância da cultura no Brasil teve início a partir de 1970 com o incentivo do governo federal para as agroindústrias canavieiras na tentativa de solucionar a crise energética emergente, frente à potencialidade da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável (BARELA, 2005).

A importância da cana-de-açúcar pode ser atribuída a sua múltipla utilização, sendo empregada *in natura* sob a forma de forragens, para a alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, água ardente, açúcar e álcool (BARELA, 2005). Segundo Novaretti (1981), a grande importância da cultura não deriva somente do seu significado como volume de produção ou emprego de mão-de-obra, mas também porque constitui componente relevante na dieta da população brasileira.

Na safra de 2005, a cultura da cana-de-açúcar ocupou 5.791.792 ha, com o rendimento total de 422,9 milhões de toneladas. Em 2006, a cultura ocupou 6.067.940 ha, 4,77% superior ao ano anterior, com um rendimento total de 446,0 milhões de toneladas, 5,46% a mais que em 2005 (IBGE, 2006). A agroindústria canavieira representa cerca de 1 milhão de empregos diretos e de 3 a 5 milhões de empregos

indiretos, sendo que somente no estado de São Paulo a cadeia canavieira corresponde a 40% dos empregos rurais e 35% da renda agrícola (CARVALHO, 1999).

Um dos principais problemas na cultura da cana-de-açúcar é a presença de plantas daninhas. As daninhas interferem no processo produtivo da cana-de-açúcar, competindo pelos recursos do meio, principalmente água, luz e nutrientes, liberando substâncias alopáticas, atuando como hospedeiros de pragas, doenças e nematóides comuns à cultura, e interferindo na colheita (PITELLI, 1985). O controle de daninhas na cultura da cana-de-açúcar se faz principalmente pela utilização de herbicidas, de modo que a cultura representa a segunda em consumo de herbicidas no Brasil, atrás apenas da cultura de soja (PROCÓPIO et al., 2003).

Uma alternativa ao tempo gasto e aos custos de produção no controle de daninhas vem sendo o desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas para tolerância a herbicidas mais fortes, reduzindo o número de aplicações e conseqüentemente o gasto com o produto.

2.4 Plantas geneticamente modificadas

O advento da engenharia genética em plantas vem criando cultivares geneticamente modificados com características específicas para a resistência a herbicidas, insetos, patógenos e estresse ambiental (LIU et al., 2005). Estas características proporcionam o aumento na produção e redução de gastos com controle de doenças e insetos, proporcionando maior rendimento econômico (LIU et al., 2005).

As primeiras plantas geneticamente modificadas foram desenvolvidas a partir de 1983, quando um gene de resistência a um antibiótico foi inserido em plantas de fumo (GUERRANTE, 2003).

Entre 1986 e 1995, 56 culturas diferentes já haviam sido testadas para as mais variadas características em mais de 3,5 mil experimentos em 34 países. Entre os anos de 1996 e 1997 o número de experimentos havia subido para 10 mil, com a participação de 45 países (GUERRANTE, 2003).

Em países aonde esta tecnologia vem sendo desenvolvida, a área utilizada para o cultivo comercial de PGMs cresceu consideravelmente de 1,7 milhões de hectares em

1996 para 67,7 milhões em 2003 (JAMES, 2005). Entre os anos de 2003 e 2005 o aumento foi de 31% no cultivo mundial de PGMs, representando 90 milhões de hectares. Atualmente 21 países adotam o plantio de PGMs sendo os principais produtores os Estados Unidos com 49,8 milhões de hectares, seguido por Argentina e Brasil com 17,1 e 9,4 milhões de hectares, respectivamente (JAMES, 2005). Segundo James (2005), o cultivo de transgênicos nestes três países representa 82% de toda a produção de PGMs no mundo.

O plantio de cultivares geneticamente modificados está associado às culturas de maior importância econômica como: soja, com 55 milhões de hectares, milho com aproximadamente 18 milhões de hectares, algodão com 7 milhões de hectares e canola com 3 milhões de hectares. A grande maioria das plantas apresenta resistência a herbicidas (aproximadamente 65 milhões de hectares) e o restante apresenta resistência a insetos ou resistência múltipla a insetos e herbicidas (JAMES, 2005).

No caso da cana-de-açúcar brasileira, não existem ainda variedades liberadas para o plantio comercial, de modo que o plantio da cana-de-açúcar geneticamente modificada está restrito a pesquisa.

2.5 Modo de ação e tolerância aos herbicidas derivados de imidazolinonas

Os herbicidas derivados de imidazolinonas controlam daninhas pela inibição da enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS), também conhecida como acetolactato sintase (ALS), importante para a biosíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, leucina e valina (SHANER; ANDERSON; STIDHAM, 1984, TAN et al., 2005). A enzima AHAS é relativamente conservada estando presente em bactérias, fungos e plantas, sendo localizada nas mitocôndrias dos fungos e nos cloroplastos das plantas (PANG; DUGGLEBY, 1999). As seqüências deduzidas de aminoácidos de AHAS em fungos e plantas são similares entre si e apresentam alta correlação com a subunidade maior de AHAS em bactérias, sugerindo que todas as AHAS são derivadas de um único ancestral comum (PANG; DUGGLEBY, 1999). Evidências sugerem que o sítio de ligação dos herbicidas derivados de imidazolinonas está relacionado com a subunidade catalítica (maior) da enzima AHAS e que mutações

nesta subunidade têm gerado organismos resistentes ao mesmo (CHANG; DUGGLEBY, 1998). A estrutura primária da subunidade maior de AHAS é composta de aproximadamente 670 aminoácidos, variando de espécie para espécie (MAZUR; CHUI; SMITH, 1987; PANG; DUGGLEBY; GUDDAT, 2002). As mutações que normalmente conferem resistência as imidazolinonas estão relacionadas a substituições de aminoácidos nas posições Ala122, Pro197, Ala205, Trp574 e Ser653, sendo a alteração Ser653 a única que não induz tolerância cruzada a outros inibidores de AHAS (TRANEL; WRIGHT, 2002; TAN et al., 2005).

As imidazolinonas estão entre os cinco grupos de famílias que inibem a enzima AHAS, sendo os outros quatro as sulfonilureas, triazolepirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos e sulfonilamino-carboniltriázolinonas (MALLORY-SMITH; RETZINGER, 2003). As imidazolinonas incluem imazapyr, imazapic, imazethapyr, imazamox, imazamethabenz e imazaquin (TAN et al., 2005).

As plantas de cana-de-açúcar transgênicas para a resistência ao herbicida imazapyr (IMI-01) carregam uma construção plasmidial que possui um variante do gene AHAS de trigo (alterado na posição 653 com a substituição de uma serina por uma asparagina) e um promotor da ubiquinona da cana-de-açúcar (ULIAN¹, comunicação pessoal). A presença do plasmídeo com o gene de resistência de trigo permite a cana-de-açúcar sobreviver na presença do herbicida imazapyr.

2.6 Efeito das plantas transgênicas sobre comunidades microbianas

Poucos estudos foram realizados para se avaliar o efeito das plantas transgênicas sobre suas comunidades microbianas. Entretanto, pode-se levantar a hipótese de que as plantas transgênicas podem deixar no solo os produtos dos genes nelas introduzidos, afetando assim sua microbiota associada, e que os tratamentos empregados nas plantas transgênicas, como por exemplo a aplicação de fortes herbicidas, podem reduzir ou promover o crescimento de certas espécies de microrganismos (DUNFIELD; GERMIDA, 2004).

¹ ULIAN, E.C. Centro de Tecnologia Canavieira.

Heuer e Smalla (1999), analisando a comunidade bacteriana da filosfera de plantas de batata alteradas geneticamente com a introdução do gene da síntese de lisozima, observaram um aumento da colonização da planta por bactéria do grupo de *Erwinia* e redução de *Agrobacterium* e bactérias gram-positivas. Mais recentemente, Heuer et al. (2002) avaliaram, por meio de métodos dependentes (FAME, BIOLOG) e independentes (DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) de cultivo, a comunidade bacteriana da rizosfera em diferentes períodos de desenvolvimento de plantas de batata com o gene da lisozima. Os autores observaram que fatores ambientais como solo e sazonalidade, alteram mais a comunidade microbiana da rizosfera do que a expressão do gene da lisozima nas PGMs.

Utilizando plantas de canola (*Brassica napus* cv. Quest) geneticamente modificadas com o gene de resistência ao glifosato, Siciliano et al. (1998) verificaram que o cultivar transgênico apresenta uma comunidade bacteriana endofítica e da rizosfera diferente daquelas observadas nos cultivares não transgênicos nas mesmas condições, mas as implicações dessa alteração sobre o desenvolvimento da planta não foram avaliadas. Posteriormente, Siciliano e Germida (1999) avaliaram a comunidade bacteriana endofítica da rizosfera dos cultivares Quest (geneticamente alterado), Excel (cultivar não transgênico que deu origem ao cultivar Quest) e Parkland (não transgênico) de *Brassica rapa*. Os autores observaram uma maior similaridade entre a comunidade bacteriana associada aos cultivares Excel e Parkland do que entre os cultivares Excel e Quest, mostrando que a presença do gene de resistência ao glifosato pode alterar a interação da canola com a microbiota endofítica e da rizosfera.

Tatli, Gullu e Ozdemir (2004) observaram, em um estudo realizado ao longo de dois anos, que plantas de milho transgênicas (Bt) possuíam uma diversidade de espécies de fungos, associados às raízes, menor que a apresentada por plantas convencionais. Entretanto, os mesmos também observaram que a taxa de infecção pelo fungo fitopatogênico *Fusarium moniliforme* (*Gibberella moniliformis*) foi maior em plantas convencionais que em plantas transgênicas, indicando uma alteração nas relações entre patógenos, hospedeiros e simbioses.

Lewis et al. (2001), por sua vez, não observaram diferenças significativas entre plantas de milho Bt e plantas de milho convencionais quanto à colonização pelo fungo

endofítico entomopatogênico *Beauveria bassiana*, indicando que a associação simbiótica entre o endófito e as plantas transgênicas não foi comprometida.

Trabalhos realizados por Asao, Arai e Nishizawa (2003), com plantas de morango geneticamente modificadas com o gene da quitinase do arroz, também demonstraram não haver diferenças entre as comunidades microbianas de bactérias e fungos de plantas transgênicas e convencionais.

Não existe um consenso a respeito dos efeitos das PGMs sobre as comunidades microbianas, de modo que trabalhos científicos relatam tanto os efeitos negativos quanto neutros (DUNFIELD; GERMIDA, 2004; KOWALCHUK; GERARDS; WOLDENDORP, 2003). Embora alguns trabalhos tenham sido realizados na busca de estabelecer uma correlação entre PGMs e seus efeitos sobre comunidades microbianas, a grande maioria destes foi desenvolvido em ambientes temperados, de modo que os efeitos sobre comunidades microbianas em ambientes tropicais são desconhecidos.

2.7 Variabilidade genética por ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*) e seqüenciamento do rDNA

Um dos grupos de genes mais utilizados para estudos taxonômicos e de variabilidade genética em fungos é o que codifica o RNA ribossômico. A maior razão da popularidade do rDNA para análises filogenéticas é que este é um gene de múltiplas cópias, que não codifica proteínas, muito conservado e presente em todos os organismos, servindo como referência para estudos de divergência evolutiva, e que é considerado, muitas vezes, como um gene de locus simples (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999).

O rDNA apresenta-se como um cluster gênico composto pelos genes 18S, 5.8S e 25-28S (Figura 1). Entre estes genes encontram-se as regiões variáveis ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico (FUNGARO, 2000).

Comparações das seqüências de rDNA 16S e 18S (também chamadas de subunidades menores [SSU]) tem permitido acessar as relações filogenéticas entre a maioria dos grupos de organismos (WOESE; KANDLER, WHEELIS, 1990).

Os métodos mais recentes e amplamente utilizados para a taxonomia de fungos têm sido as técnicas de seqüenciamento e os métodos eletroforéticos (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999).

Dentro dos métodos eletroforéticos destaca-se a utilização da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica envolve a digestão de amostras de DNA por enzimas de restrição (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999). Uma variação desta técnica é conhecida como ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*) e consiste da digestão enzimática do rDNA amplificado por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (VANEECHOUTTE et al., 1992). Os fragmentos de rDNA gerados e observados em gel de agarose podem ser tabulados e utilizados para a construção de árvores filogenéticas.

A técnica de ARDRA vem sendo utilizada para o estudo de variabilidade genética, permitindo a distinção de espécies intimamente relacionadas. Neste contexto, Oliveira e Costa (2002) estudando a variabilidade genética de *Fusarium solani* conseguiram através do ARDRA, diferenciar *formae specialis* em soja e feijoeiro. Martins (2005) trabalhando com isolados de *Fusarium* observou uma grande variabilidade genética, com a presença de 19 haplótipos em 83 isolados estudados. Entretanto, este autor não conseguiu diferenciar por esta técnica os isolados patogênicos dos endofíticos.

Trabalhos com o fungo *Crinipellis pernicioso*, utilizando ARDRA com três endonucleases diferentes para a região ITS do rDNA, demonstraram não ser possível diferenciar entre isolados endofíticos e patogênicos, sugerindo que as regiões ITS do rDNA permitem uma boa diferenciação interespecífica, mas não são suficientemente variáveis para a diferenciação intraespecífica (ARRUDA et al., 2003; LANA, 2004).

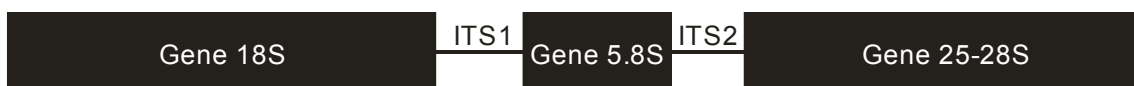


Figura 1 – Estrutura do cluster gênico que codifica o RNA ribossômico em fungos (Fonte: FUNGARO, 2000 – modificado)

2.8 Análise da diversidade de microrganismos utilizando técnicas independentes de cultivo

O cultivo *in vitro* de microrganismos requer condições específicas de nutrientes, temperatura e pH para o desenvolvimento das colônias microbianas. Para microrganismos pouco exigentes, as técnicas de isolamento utilizando meios de cultura pobres em nutrientes produzem resultados satisfatórios, entretanto uma parcela considerável de microrganismos não pode ser estimada por dependerem de condições de cultivo específicas. As técnicas dependentes de cultivo para a análise ecológica de microrganismos produzem apenas uma seletiva e invariável janela da real diversidade de um determinado ambiente (ANDERSON; CAIRNEY, 2004).

O fator específico que promoveu o avanço do estudo ecológico de bactérias foi a adoção de técnicas independentes de cultivo, como a extração de DNA ou RNA diretamente do solo (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). A exploração das variações nas seqüências do gene 16S de diferentes espécies bacterianas em conjunto com a adoção de técnicas independentes de cultivo trouxe uma revolução para a ecologia de bactérias, aumentando consideravelmente o entendimento sobre a diversidade e função das bactérias em um grande número de ambientes (ANDERSON; CAIRNEY, 2004).

No caso dos fungos, estudos recentes de ecologia utilizando técnicas independentes de cultivo têm proporcionado uma maior compreensão da diversidade de fungos associados às raízes das plantas, rizoplano e rizosfera (KOWALCHUCK et al., 1997; SMIT et al., 1999; RONDON et al., 2000; WANDENKOORNHUYSE et al., 2002; FILION et al., 2004; RICHARDS; BASS, 2005).

As análises independentes de cultivo englobam principalmente as técnicas de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) e meta-análise ou análise metagenômica.

DGGE e TGGE são técnicas similares que separam fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com seqüências de nucleotídeos diferentes (conteúdos de C+G diferentes). A separação das fitas se baseia na diminuição da mobilidade eletroforética de um DNA dupla fita parcialmente desnaturado em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de substâncias desnaturantes (DGGE) ou um gradiente linear de

temperatura (TGGE) (MUYZER; SMALLA, 1998). Estas técnicas têm a habilidade de comparar numerosas amostras em um único gel, permitindo uma análise rápida de alterações ou mudanças na composição da comunidade microbiana (ANDERSON; CAIRNEY, 2004).

Alternativamente ou complementarmente às técnicas de DGGE e TGGE, a clonagem e seqüenciamento de produtos de PCR gerados diretamente de DNA ambiental (metagenoma) é uma técnica extremamente útil para acessar a diversidade de fungos em solos e plantas. (CHEN; CAIRNEY, 2002; ANDERSON; CAMPBELL; PROSSER, 2003; JUMPPONEN, 2003; GAO et al., 2005). No caso de fungos endofíticos, o único trabalho até então realizado utilizando este tipo de análise revelou uma alta diversidade de espécies associada à planta medicinal *Heterosmilax japonica*, sendo que muitas das seqüências obtidas estão provavelmente relacionadas a espécies ainda desconhecidas e sem similares nos bancos de seqüências mundiais (GAO et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de cultivo e material vegetal

O estudo foi realizado com a variedade convencional de cana-de-açúcar (SP80-1842) e sua isolinha geneticamente modificada (IMI-1) para a resistência ao herbicida imazapyr. As plantas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Eugênio Ulian (Centro de Tecnologia Canavieira - CTC, Piracicaba, SP). As plantas foram cultivadas em solo do tipo médio arenoso (pH 4,5; 2,5 mmol.dm³ de potássio; 8 mg.dm³ de fósforo total) no campo experimental do CTC, Piracicaba-SP, Brasil em 03 de abril de 2004. O experimento foi conduzido em doze parcelas (3 x 5 m) tratado como blocos inteiramente casualizados contendo três tratamentos (Figura 2): a) plantas geneticamente modificadas (IMI-1) conduzidas com capina; b) plantas geneticamente modificadas (IMI-1) tratadas com herbicida em aplicação única 2 meses após o plantio (03 de junho de 2004); c) plantas convencionais (SP80-1842) conduzidas com capina. Trinta e seis plantas de cada tratamento foram coletadas 3 e 10 meses após plantio para as análises precedentes.

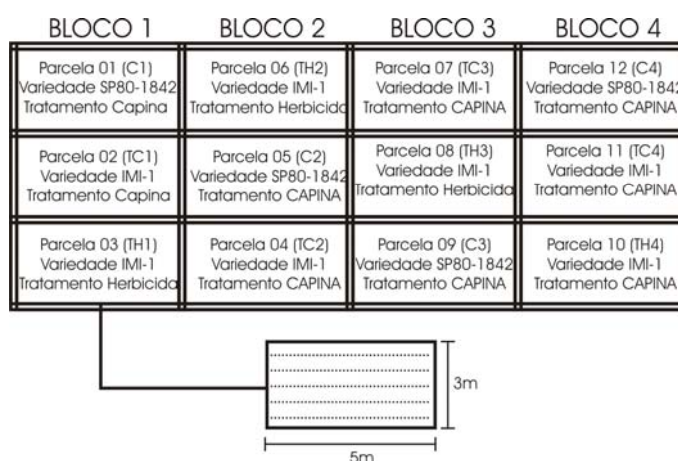


Figura 2 – Esquema do delineamento experimental considerando três tratamentos e quatro repetições montados em blocos inteiramente casualizados em um total de 12 parcelas contendo cinco linhas de cana-de-açúcar. A bordadura foi realizada com a variedade convencional SP80-1842 e a área total utilizada de 0,08 ha

3.2 Análise dependente de cultivo

3.2.1 Isolamento de fungos endofíticos

As plantas de cana-de-açúcar foram removidas do solo, armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório, onde foram lavadas em água corrente. Os fungos endofíticos foram isolados de folhas de cana-de-açúcar sem sintomas de doenças após a remoção dos microrganismos epifíticos através de lavagens seriadas em etanol 70% por 1 min, solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl⁻) por 3 min, etanol 70% por 30 segundos, e duas lavagens em água destilada esterilizada. A eficácia do processo de desinfestação superficial foi checada através do plaqueamento de alíquotas da água da última lavagem em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, pH 6,8 contendo 200g de batata, 20g de dextrose e 15 g de ágar para cada 1000mL de água; autoclavado 25 min. 120°C). Após a desinfestação superficial, as folhas foram cortadas em pedaços de 5-7 milímetros e transferidas assepticamente (seis fragmentos/placa) para placas contendo BDA suplementado com 100 µg/mL de penicilina e tetraciclina (USB Corporation) em um total de 34 placas por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C e observadas todos os dias durante 30 dias de forma a isolar tanto os microrganismos de crescimento rápido quanto os de crescimento lento. As colônias emergentes foram purificadas e mantidas a 4°C para análises futuras.

3.2.2 Extração de DNA, análise de restrição do rDNA (ARDRA) e seqüenciamento de nucleotídeos

A extração do DNA foi realizada a partir das colônias de fungos de acordo com Raeder e Broda (1985). A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi realizada utilizando-se os iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4R (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') em termociclador Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 24 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s, e após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 7min. Para a reação de PCR foram utilizados 3ng de DNA

molde, 0,4 μ M de cada iniciador, 3,7mM de MgCl₂, 250 μ M de cada dNTP, 2U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 50mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 20mM de KCl em 50 μ L de volume final. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) corados em brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

A análise de restrição foi realizada com 20 μ L do produto de PCR utilizando as enzimas *Mbo* I e *Bsu*RI (Fermentas) de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 2,0% (m/v) corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

Os rDNAs de isolados representativos de cada haplótipo foram seqüenciados permitindo a identificação das espécies mais freqüentes. Para a reação de seqüenciamento foram utilizados 200-500ng de DNA, 2 μ L do tampão de seqüenciamento 5X (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM MgCl₂), 10 pM do iniciador ITS-1 ou ITS4R, 0,4 μ L de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perking Elmer Applied Biosystems) e água Milli-Q estéril para o volume final de 10 μ L. A amplificação foi realizada conforme o ciclos descritos anteriormente. Os produtos de PCR foram precipitados em isopropanol 65% (v/v) a temperatura ambiente por 15 min, sendo em seguida centrifugados a 3.000 rpm por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi seca em papel absorvente antes da adição de 200 μ L de etanol 60%. Foi realizada outra centrifugação a 3.000 rpm por 10 min a 4°C, a lavagem com etanol 60% foi repetida e o sobrenadante foi descartado, sendo o pellet seco em temperatura ambiente. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador ABI 3700 (Applied Biosystems).

3.2.3 Montagem dos dendrogramas e análise das seqüências

Os diferentes padrões de restrição gerados por ARDRA para a população de fungos endofíticos foram utilizados para calcular a similaridade genética entre os isolados. A similaridade foi calculada com o programa NTSYSpc ver. 2.01e (Applied Biostatistics Inc.) com base no coeficiente *Simple Matching*, e o agrupamento foi realizado pelo método UPGMA – *unweighted pair-group arithmetic average*.

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas pelo programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1997) através da base de dados do NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento das seqüências e a análise filogenética foram conduzidos através do programa MEGA versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). O agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Neighbor-Joining* (NJ) para 1000 replicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes e Cantor.

3.2.4 Análise de diversidade e análise molecular de variância (AMOVA)

A estimativa de diversidade genética presente na comunidade de fungos endofíticos de cana-de-açúcar foi calculada com base no índice de diversidade de Shannon (H') (MAGURRAN, 1988). Comparações entre os valores de diversidade de diferentes comunidades permitem identificar a presença de perturbações externas influenciando a distribuição de espécies nas mesmas. Para o cálculo de diversidade foi utilizado o programa ADE4-Ecological Data Analysis: Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences versão 2001 (THIOULOUSE et al., 1997), sendo considerados o número total de haplótipos em cada tratamento e suas abundâncias relativas. O cálculo de AMOVA foi utilizado para estimar o quanto de variação genética entre as comunidades foi atribuído a divergências entre os cultivares, manejo da cultura e períodos de coleta. A AMOVA foi calculada através do programa Arlequin versão 2.0 (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) considerando 16000 replicatas. Os grupos de haplótipos obtidos na análise por ARDRA foram utilizados como dados binários para AMOVA. As comparações entre os diferentes tratamentos foram realizadas considerando as diferentes estruturas populacionais dos fungos endofíticos encontrados em cada tratamento e seus perfis de restrição (Apêndice B).

3.3 Análise independente de cultivo (análise metagenômica)

3.3.1 Extração do DNA, amplificação e clonagem da região 18S do rDNA

Foram coletadas, aos 03 meses de cultivo, cinco folhas de cana-de-açúcar de cada um dos tratamentos analisados. As folhas tiveram suas superfícies limpas conforme descrito para o isolamento de fungos endofíticos (item 3.2.1) e o DNA total extraído de acordo com o protocolo para extração de DNA vegetal para plantas com alta concentração de polissacarídeos (DOYLE; DOYLE, 1990). O DNA vegetal foi extraído de uma região de 1cm² de cada folha, sendo as extrações misturadas para cada um dos tratamentos a fim de minimizar erros de amostragem. A reação de PCR foi realizada utilizando os iniciadores EF3 (5' TCCTCTAAATGACCAAGTTTG 3') e EF4 (5' GGAAGGG[G/A]TGTATTTATTAG 3') que amplificam uma região de 1,5 Kb do 18S rDNA de fungos (SMIT et al., 1999). As amplificações foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo Tampão 1x (50mM de KCl, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 3,7mM de MgCl₂, 1mM de dNTP, 2U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,1µM de cada iniciador e aproximadamente 3ng de DNA. Para a amplificação foi utilizado o termociclador *Peltier Thermal Cycler 200* (MJ Research) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1min, 48°C por 1min e 72°C por 2min, e uma extensão final a 72°C por 10min. Os produtos da amplificação foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) corado com brometo de etídeo. As bandas referentes a 1,5 Kb (tamanho esperado para o gene 18S) foram recortadas e purificadas utilizando-se o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). Os produtos da purificação foram clonados em vetor pGEM-T utilizando-se o kit de clonagem pGEM-T *Easy Vector System* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As ligações foram transformadas em *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes utilizando-se eletroporador *Gene Pulser II Apparatus* (Bio-Rad).

3.3.2 Extração dos plasmídeos e seqüenciamento

As colônias contendo os plasmídeos com insertos do gene 18S rDNA foram crescidas em microplacas contendo 1 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB, pH 7,0 contendo 10g de triptona bacteriana, 5g de extrato de levedura, 5g de cloreto de sódio e 15g de agar para cada 1000mL de água destilada; autoclavado 25min 120°C) acrescido de ampicilina (100 µg/mL), em agitação (1200 rpm) por 22 horas a 37°C. Posteriormente, as microplacas foram centrifugadas por 6 min (3000 rpm) a 20°C, o sobrenadante foi removido e as microplacas foram colocadas em freezer a -80°C por 15min. As microplacas foram colocadas novamente a 37°C por 10 min, seguindo a adição de 25µL de água Milli-Q. As microplacas foram agitadas em vórtex por 5 min, seguindo a adição de 70µL da solução de lise STET-Tween 20 [Tris-HCl 10mM (pH 8,0); EDTA 1mM (pH 8,0); NaCl 100mM; Tween 20 (5% v/v); RNase A 232 µL/mL; Lisozima 500 µL/mL] e agitação em vortex por 1min. As microplacas foram incubadas a 37°C por 5min, e colocadas em forno microondas à potencia máxima por 25seg, seguindo a adição de 400µL de água Milli-Q e agitação em vortex por 1min. As microplacas foram então resfriadas em gelo por 15min, centrifugadas (3000 rpm) por 40min a 20°C, sendo retirados 100µL da solução sobrenadante correspondente aos plasmídeos extraídos.

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados 200-500ng do DNA plasmidial, 2 µL do tampão de seqüenciamento 5X (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM MgCl₂), 10 pM do iniciador M13F ou M13R, 0,4 µL de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perking Elmer Applied Biosystems) e água Milli-Q estéril para o volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 1min e 72°C por 1min, e após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram precipitados com isopropanol 65% (v/v) em temperatura ambiente por 15 min, sendo em seguida centrifugada a 3.000 rpm por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi seca em papel absorvente antes da adição de 200 µL de etanol 60%. Foi realizada outra centrifugação a 3.000 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante

foi descartado, sendo o *pellet* seco em temperatura ambiente. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador ABI 3700 (Applied Biosystems).

3.3.3 Análise das seqüências

Seqüências representativas das bibliotecas foram analisadas e trimadas retirando-se as regiões do vetor plasmidial e regiões com seqüências de baixa qualidade nas posições 3'– e 5'– do gene 18S. Seqüências menores que 500 pb foram excluídas das análises. As seqüências restantes foram submetidas ao programa CHIMERA_CHECK da base de dados ribossomal (MAIDAK et al., 2001) para a avaliação da presença de seqüências quiméricas, resultando em seqüências de alta qualidade que posteriormente foram comparadas pelo programa BLAST com a base de dados do NCBI. O alinhamento das seqüências e a análise filogenética foram conduzidos através do programa MEGA ver. 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). O agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Neighbor-Joining* (NJ) para 1000 replicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes e Cantor.

4 RESULTADOS

4.1 Análises dependentes de cultivo

4.1.1 Isolamento de fungos endofíticos de folhas de cana-de-açúcar

O número total de fungos endofíticos isolados de folhas de cana-de-açúcar aos três meses (1º isolamento) e aos 10 meses (2º isolamento) foi de 367 e 522, respectivamente. A frequência total de colonização foi maior no segundo isolamento do que no primeiro, correspondendo a 2,55 e 1,80 UFC.fragmento⁻¹, respectivamente. Embora a frequência de colonização tenha sido maior no segundo isolamento, as frequências de colonização entre plantas convencionais e transgênicas, tratadas ou não com o herbicida, não foram significativamente diferentes (Tabela 1), indicando que a presença do transgene ou a aplicação do herbicida não influenciaram a capacidade da planta em alocar os fungos endofíticos. O aumento do número total de isolados endofíticos observado ao longo do tempo tem correlação com a sazonalidade e idade da planta, como já descrito para outras monocotiledôneas (BROWN; HYDE; GUEST, 1998; BUSSABAN et al., 2001; RODRIGUEZ, SAMUELS, 1990). Os fatos que podem contribuir para estas mudanças ao longo da idade da planta estão relacionados ao aumento da exposição a propágulos em relação ao tempo e mudanças fisiológicas nos tecidos das mesmas (ESPINOSA-GARCIA; LONGENHEIM, 1990).

Tabela 1 – Frequência de colonização de fungos endofíticos

Época de coleta	Tratamento de cana-de-açúcar	Frequência de colonização (UFC.fragmento ⁻¹)*
Três meses	Convencional	0.601 ^a
	Transgênicas conduzidas com capina	0.617 ^a
	Transgênicas tratadas com herbicida	0.583 ^a
Dez meses	Convencional	0,837 ^b
	Transgênicas tratadas com herbicida	0,855 ^b
	Transgênicas conduzidas com capina	0,864 ^b

* Letras iguais não representam diferenças significativas para o teste Tukey a 5% de significância

Os fungos isolados foram inicialmente separados em 5 grupos distintos com base nas colorações das colônias, visando facilitar análises futuras (Figura 3).

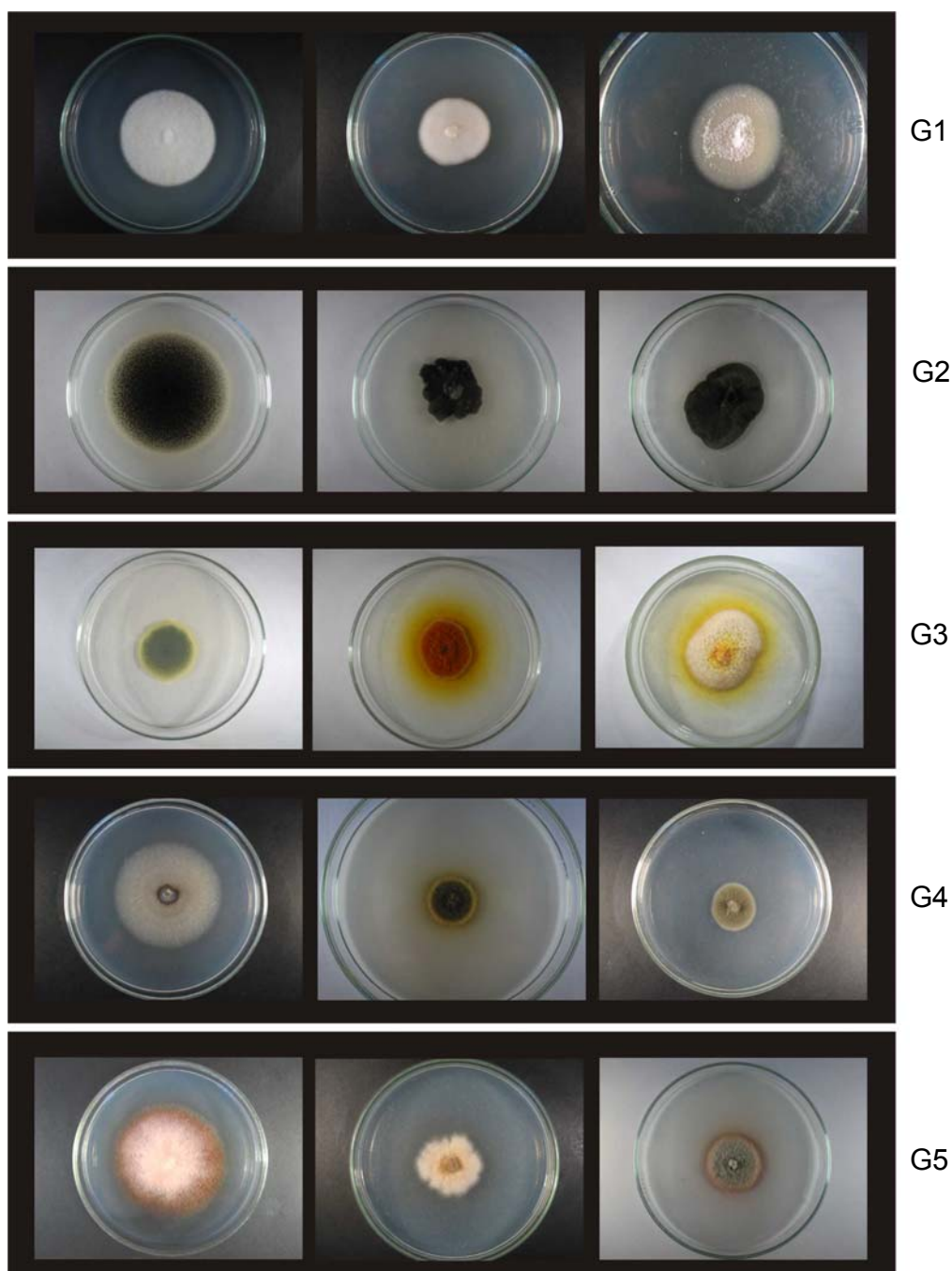


Figura 3 – Exemplos das colorações de colônias dos grupos de fungos endofíticos isolados de folhas de cana-de-açúcar. **G1** – fungos de cor branca; **G2** – fungos de cor preto/cinza; **G3** – fungos de cor verde/amarela; **G4** – fungos de cor bege/marrom; **G5** – fungos de cor vermelha/rosa

4.1.2 Análise de restrição do rDNA (ARDRA)

O total de 150 isolados de cana-de-açúcar (25 para cada tratamento aos três e aos dez meses de isolamento) foram selecionados para as análises por ARDRA com as enzimas de restrição *BsuRI* e *Mbol*. Os isolados tiveram seu DNA extraído e a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA amplificada por PCR. A digestão dos produtos de PCR com as enzimas de restrição *BsuRI* e *Mbol* revelou a presença de 7 e 8 perfis de restrição para cada uma das enzimas respectivamente (Figura 4A e 4B). Os perfis de restrição foram combinados e demonstraram a presença de 14 haplótipos diferentes, identificados de A a N, associados aos três tratamentos de cana-de-açúcar analisados. Foi possível observar diferenças na constituição dos haplótipos quando comparados o primeiro com o segundo isolamento. Os haplótipos D, G, H e N foram observados apenas no segundo isolamento, enquanto os haplótipos C, F e L ocorreram exclusivamente no primeiro (Figura 5A e B). Diferenças na constituição de haplótipos também foram relacionadas aos tratamentos de cana-de-açúcar. Os haplótipos B, E e L foram apenas encontrados em plantas convencionais e em plantas transgênicas conduzidas com capina, não sendo encontrados em plantas transgênicas tratadas com o herbicida imazapyr. Isto indica que a aplicação do herbicida pode ter influenciado negativamente o estabelecimento das espécies de fungos relacionadas a estes haplótipos. Contrariamente, os haplótipos D e C foram encontrados exclusivamente em plantas transgênicas tratadas com o herbicida, indicando que este pode ter induzido a colonização por aqueles haplótipos. O efeito da presença do transgene pôde ser mais bem observado com os haplótipos H e J. Enquanto o haplótipo H foi encontrado exclusivamente em amostras convencionais, indicando a influencia negativa da transgenia em seu estabelecimento, o haplótipo J foi induzido de forma positiva, ocorrendo em plantas transgênicas tratadas ou não com herbicida. Estes resultados sugerem que tanto a presença do transgene quanto a aplicação do herbicida podem influenciar de forma positiva ou negativa a colonização e estabelecimento dos diferentes haplótipos fúngicos nos tecidos foliares de cana-de-açúcar.

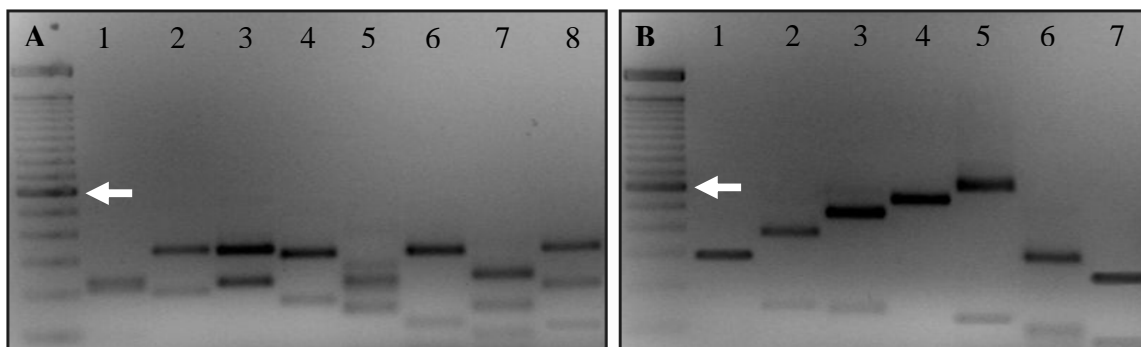


Figura 4 – Gel de agarose 2,4% com os diferentes perfis de restrição identificados para cada enzima. **A** – Oito perfis obtidos com a enzima *MboI*; **B** – Sete perfis obtidos com a enzima *BsuRI*. Setas indicam 600pb no marcador ladder 100pb (Invitrogen)

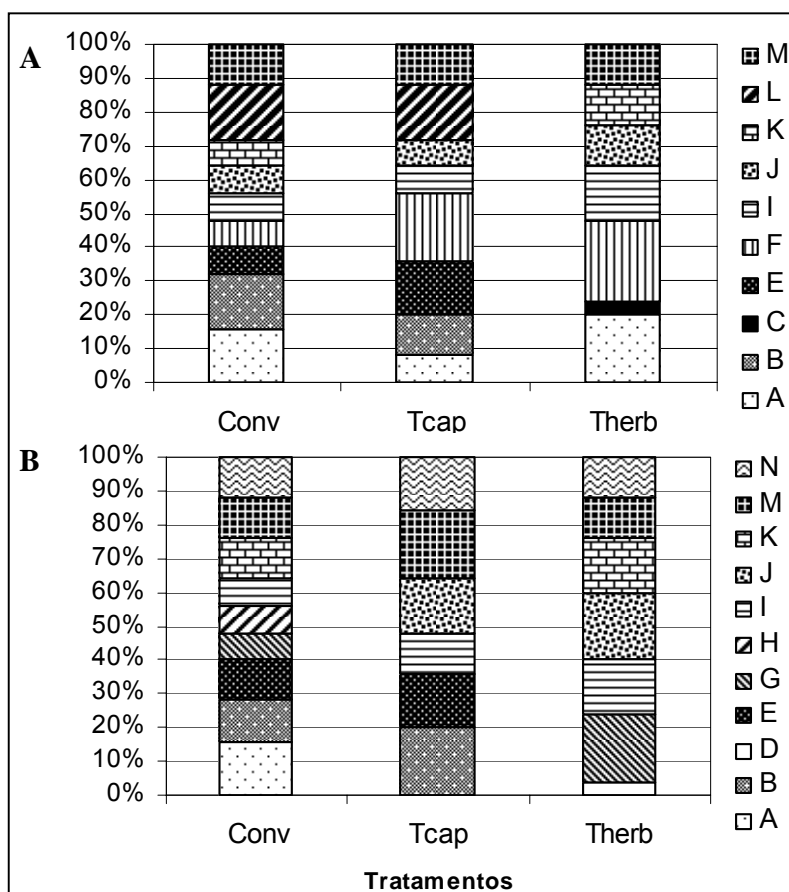


Figura 5 – Porcentagem de distribuição dos haplótipos de fungos endofíticos de folhas nos diferentes tratamentos de cana-de-açúcar analisados. **A** – Haplótipos referentes a 1ª coleta (3 meses após o plantio); **B** – Haplótipos referentes a 2ª coleta (10 meses após o plantio). Letras de A a N indicam os 14 haplótipos observados. Conv – plantas convencionais; Tcap – plantas transgênicas conduzidas com capina; Therb – plantas transgênicas tratadas com herbicida

A similaridade genética entre os 14 haplótipos analisados foi calculada com base no padrão binário dos perfis de restrição gerados pelas enzimas *Mbol* e *BsuRI* através do coeficiente *Simple Matching* (Figura 6). O dendrograma gerado demonstrou a presença de haplótipos geneticamente distintos com similaridades mínima e máxima de 58 e 86%, respectivamente.

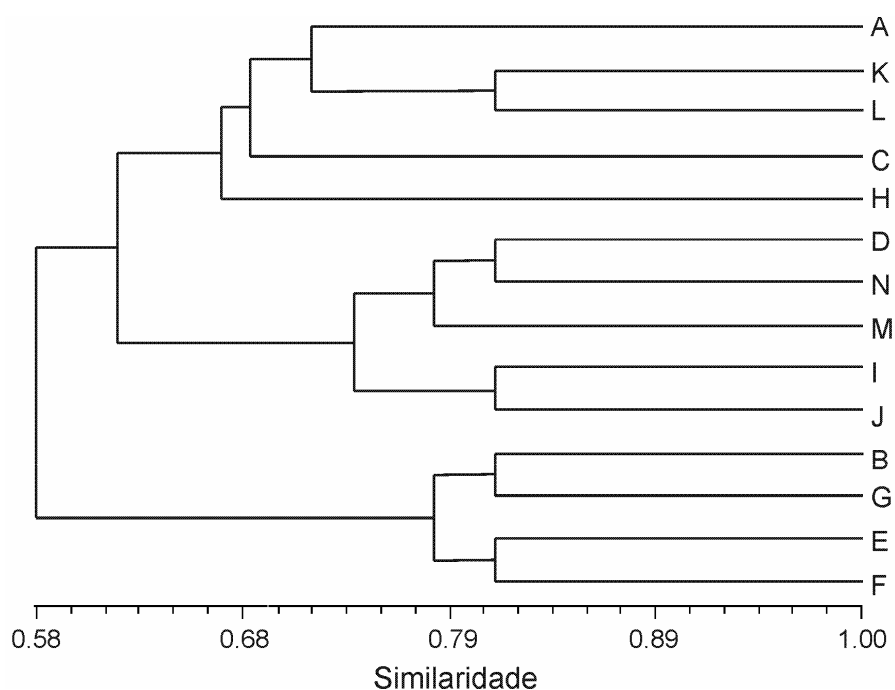


Figura 6 – Similaridade genética entre os diferentes haplótipos de fungos endofíticos isolados de cana-de-açúcar convencional e transgênicas (tratadas ou não com herbicida) com base no coeficiente de similaridade de *Simple Matching*

4.1.3 Análise molecular de variância (AMOVA) e análise de diversidade de Shannon

O índice de diversidade de Shannon foi calculado com base na abundância relativa de haplótipos endofíticos isolados aos três e dez meses de plantio de cana-de-açúcar convencional e transgênica. Pelo índice, os maiores valores de diversidade observados estão relacionados à comunidade de fungos endofíticos de plantas convencionais, tanto aos três ($H' = 3,094$) quanto aos dez meses ($H' = 3,133$) de coleta. Plantas transgênicas conduzidas com capina demonstraram uma redução de $H' = 2,919$

aos três meses para $H' = 2,665$ aos 10 meses, enquanto que plantas transgênicas tratadas com herbicida mantiveram praticamente os mesmos valores de diversidade para a primeira e segunda coleta ($H' = 2,668$ e $H' = 2,695$ respectivamente). Segundo Margalef (1972), os valores de diversidade usualmente variam em torno de 1,5 e 3,5, raramente ultrapassando 4,5. Quanto maior a diversidade de uma ambiente, maior sua plasticidade funcional e maior sua estabilidade, de modo que perturbações externas possuam pouco efeito na funcionalidade do mesmo (MAGURRAN, 1988; PERFECT, 1994; GLIESSMAN, 2000). Ambientes com baixa diversidade se mantêm em desequilíbrio constante, estando sujeitos ao desaparecimento permanente de espécies importantes para a manutenção do ecossistema (MAGURRAN, 1988).

A análise dos grupos de fungos endofíticos dois a dois através de AMOVA foi realizada para detectar a porcentagem de variação genética atribuída às divergências entre os cultivares, manejo e épocas de coleta de cana-de-açúcar (Tabela 2A, B e C). A AMOVA detectou a presença de variação genética significativa entre os haplótipos de fungos isolados aos 3 e aos 10 meses de plantio (4,12%, $P < 0,05$), indicando que o envelhecimento da planta induz alterações no grupo de fungos endofíticos de folhas de cana-de-açúcar (Tabela 2A). No entanto, esta variação está relacionada principalmente as plantas transgênicas conduzidas com capina (6,33%, $P < 0,05$) e plantas transgênicas tratadas com herbicida (5,57%, $P < 0,05$), uma vez que variações na comunidade de fungos endofíticos das plantas convencionais não foram detectadas com o passar do tempo (-3,40%, $P = 0,969$). A comparação entre os haplótipos isolados de plantas convencionais e de plantas transgênicas conduzidas com capina (Tabela 2B) revelou a ausência de variação entre estas amostras nos primeiros 3 meses (-1,66%, $P = 0,683$) e a presença de variação aos 10 meses (2,32%, $P < 0,05$). Este fato demonstra que a transgenia induziu possíveis mudanças na comunidade endofítica que foram detectadas em longo prazo. Contrariamente a isto, a comparação entre os haplótipos isolados de plantas transgênicas conduzidas com capina e plantas transgênicas tratadas com herbicida (Tabela 2C) demonstrou uma presença de variação aos 3 meses (2,11%, $P < 0,01$) que tendeu a nulidade aos 10 meses (0,72%, $P = 0,273$). Este resultado indicou que a aplicação do herbicida imazapyr possivelmente induziu rapidamente mudanças transientes, que foram detectadas em sua maioria aos três meses de plantio, logo após

a aplicação do mesmo. A AMOVA detectou que tanto a transgenia quanto a aplicação do herbicida produziram alterações na comunidade de fungos endofíticos de cana-de-açúcar. A aplicação do herbicida induziu mudanças rápidas na comunidade de fungos, sendo detectadas logo após a aplicação, enquanto que a transgenia influenciou lentamente a comunidade endofítica, sendo percebida somente na segunda coleta.

Tabela 2 – Análise de variância molecular (AMOVA) entre os haplótipos de fungos endofíticos isolados de folhas de cana-de-açúcar

A. Variação relativa à idade da planta			
1ª coleta vs. 2ª coleta	% variação ^a	valor de <i>P</i> ^b	Φ ST ^c
Amostra total	4,12	< 0,01	0,062
Plantas convencionais	-3,40	(n.s.) 0,969	-0,034
Plantas transgênicas conduzidas com capina	5,57	< 0,05	0,056
Plantas transgênicas tratadas com herbicida	6,33	< 0,05	0,063
B. Variação relativa ao cultivar			
Plantas convencionais vs. Plantas transgênicas conduzidas com capina	% variação ^a	valor de <i>P</i> ^b	Φ ST ^c
Amostra total	1,47	< 0,01	0,025
1ª coleta	-1,66	(n.s.) 0,683	-0,017
2ª coleta	2,32	< 0,05	0,023
C. Variação relativa ao manejo			
Plantas transgênicas conduzidas com capina vs. Plantas transgênicas tratadas com herbicida	% variação ^a	valor de <i>P</i> ^b	Φ ST ^c
Amostra total	6,01	< 0,01	0,041
1ª coleta	2,11	< 0,01	0,021
2ª coleta	0,72	(n.s.) 0,273	0,007

^a Porcentagem de variação entre os grupos analisados

^b *P* – probabilidade de existência de um componente de variação maior que o observado para o valor do índice de fixação

^c Φ ST – índice de fixação

(n.s.) – valores não significativos

4.1.4 Seqüenciamento e análise filogenética

O seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi realizado para avaliar a relação filogenética entre isolados. Pelo menos dois isolados de cada haplótipo foram aleatoriamente selecionados e seqüenciados. Os alinhamentos para construção do dendrograma foram realizados com as seqüências de maior identidade encontradas no NCBI. O dendrograma gerado demonstrou a presença de uma rica comunidade de fungos endofíticos associados a plantas de cana-de-açúcar (Figura 7). Foram

encontrados representantes de 12 famílias diferentes, todos do filo Ascomycota. Alguns dos isolados demonstraram alta similaridade com seqüências de gêneros comumente encontrados como endófitos em plantas de climas tropicais, como *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis* e *Xylaria* (ARNOLD et al., 2000; SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003; SANTAMARÍA; BAYMAN, 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005; AZEVEDO; ARAUJO, 2007). As espécies de fungos presentes no haplótipo A apresentaram alta similaridade genética com espécies de *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae), o qual é reportado como endófito de muitas espécies vegetais (BAAYEN et al., 2002; AZEVEDO; ARAUJO, 2007). Este haplótipo foi encontrado em todos os tratamentos e também demonstrou a presença de isolados com seqüências similares a de espécies da família Trichocomaceae, como *Aspergillus tubingensis* e *Aspergillus flavus*. O haplótipo C foi encontrado somente em plantas transgênicas tratadas com herbicida e apresentou similaridade com espécies de *Paecilomyces fumosoroseus* da família Clavicipitaceae. A família Nectriaceae foi representada por três haplótipos (I, G, J), sendo o haplótipo G representativo do complexo de *Fusarium solani* e os haplótipos I e J representativos do complexo de *Gibberella fujikuroi*. Os haplótipos F e B foram observados como representantes do gênero teleomorfo *Cochliobolus* da família Pleosporaceae. A fase anamórfica deste gênero é relacionada a espécies dos gêneros *Curvularia* e *Bipolaris*. A família Leptosphaeriaceae foi representada pelos haplótipos M, N e E, sendo os haplótipos M e N relacionados ao gênero *Leptosphaeria* e o haplótipo E representado pelos gêneros *Epicoccum* e *Ampelomyces*. O isolado S116 do haplótipo N foi observado também como pertencente à família Leptosphaeriaceae, entretanto sua seqüência de rDNA não mostrou alta similaridade com outras seqüências desta família depositadas no NCBI. Estes resultados demonstraram que o grupo de fungos associados à cana-de-açúcar é altamente diverso, conforme previamente constatado pelo ARDRA.

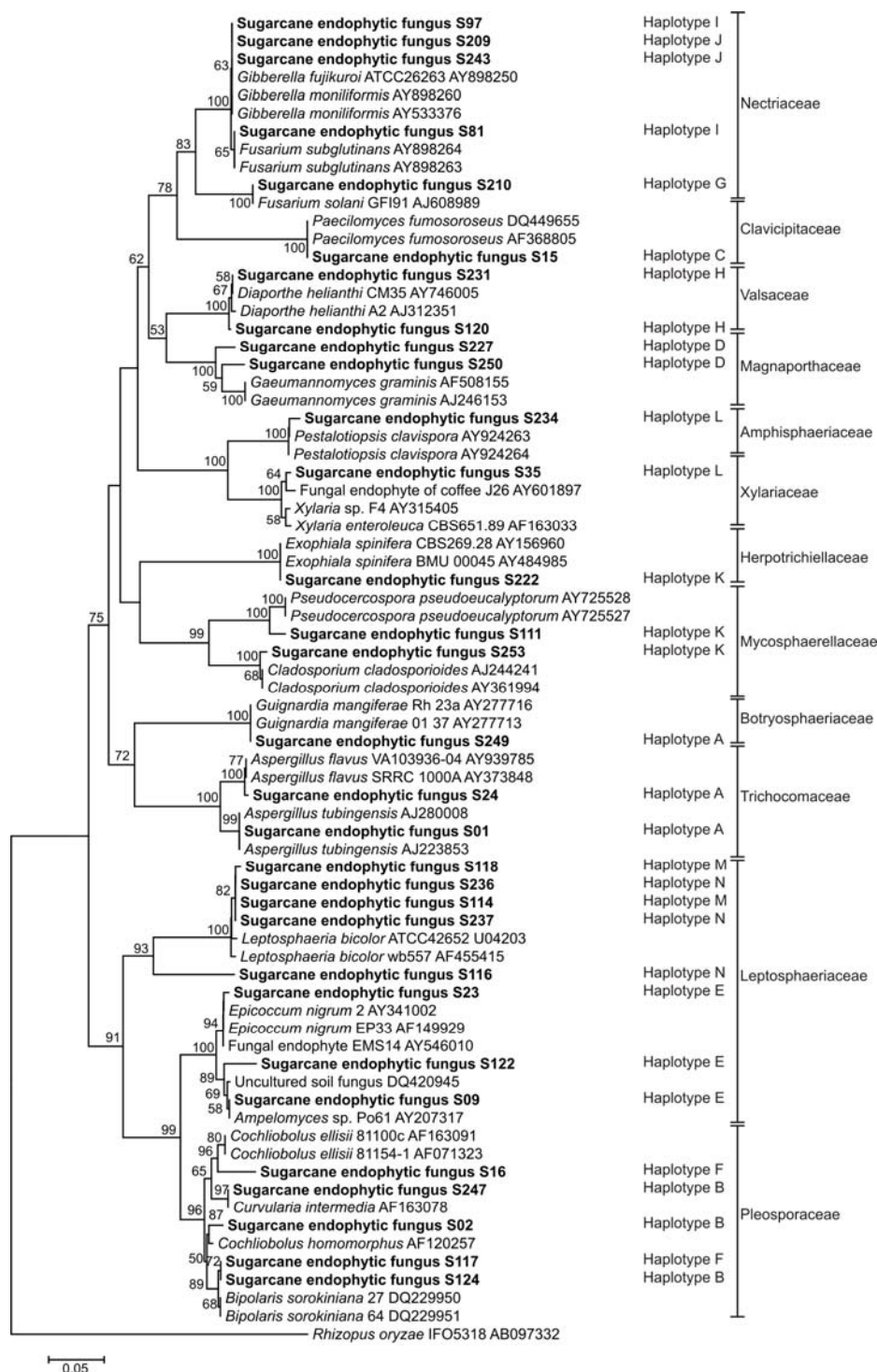


Figura 7 – Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos dos 14 haplótipos encontrados pela técnica de ARDRA. Seqüências referencia do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. O zigomiceto *Rhizopus oryzae* foi utilizado com grupo externo. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* ($n=1000$ replicatas) $\geq 50\%$ estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.05 substituições por posição

4.2 Análise metagenômica

Para avaliar a diversidade de basidiomicetos associados à cana-de-açúcar bem como os efeitos da presença do transgene e da aplicação do herbicida imazapyr sobre os mesmos, optou-se por uma técnica independente de cultivo, baseada na amplificação direta do gene 18S de fungos a partir do DNA total de folhas de cana-de-açúcar.

4.2.1 Amplificação do gene 18S, clonagem e seqüenciamento

A amplificação do 18S de fungos a partir do DNA total de folhas de cana-de-açúcar, com base nos primers EF3 e EF4 que amplificam preferencialmente basidiomicetos, demonstrou a presença de um produto de PCR de aproximadamente 1,5 Kb, conforme esperado para o tamanho do gene 18S (Figura 8A). As bandas referentes a este tamanho foram recortadas, purificadas e clonadas em *Escherichia coli*. Duzentos e oitenta e oito clones de cada tratamento tiveram seus plasmídios extraídos e checados para a presença dos insertos (Figura 8B). Os produtos de PCR obtidos após clonagem possuíam um pouco mais de 1,5Kb devido à presença das extremidades plasmidiais que flanqueiam o inserto. Destes, 96 de cada tratamento foram selecionados para seqüenciamento. A análise das seqüências revelou a presença de muitas seqüências quiméricas e de baixa qualidade. Foram consideradas apenas seqüências superiores a 500 pb e com alta qualidade, fato que reduziu drasticamente o número de seqüências disponíveis para 62 no total (Tabela 3). Os alinhamentos e análise filogenética foram conduzidos com seqüências presentes no NCBI, entretanto, como uma forma de minimizar erros, foram consideradas somente as seqüências de linhagens referência (ATCC ou CBS) e de trabalhos publicados. Para a construção das árvores foram consideradas apenas as seqüências com similaridade superior a 95%, reduzindo a amostragem para apenas 47 seqüências. O baixo número de seqüências não permitiu separar os tratamentos analisados, não sendo possível comparar os efeitos da aplicação do herbicida e da presença do transgene. Todas as

seqüências obtidas foram tratadas como sendo de fungos endofíticos de cana-de-açúcar, sem distinção de tratamento.

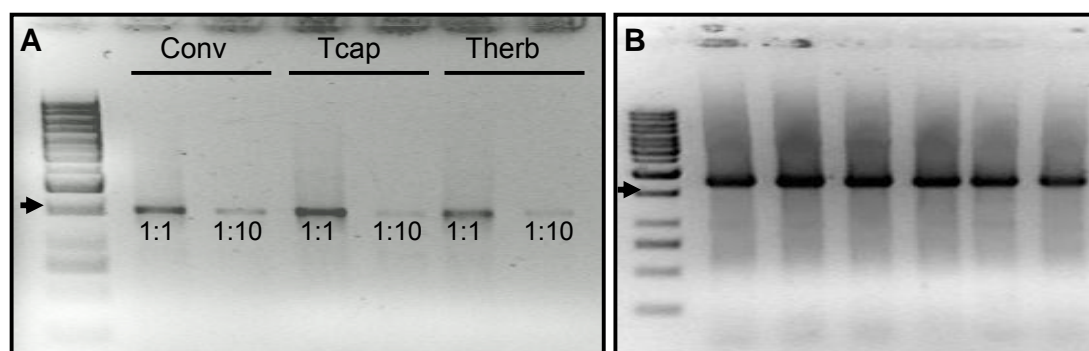


Figura 8 – Produtos de PCR referentes ao gene 18S de basidiomicetos. **A.** Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do DNA total de folhas de cana-de-açúcar nas diluições de 1:1 e 1:10. **B.** Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos plasmídios extraídos de *Escherichia coli* após a clonagem. Conv – plantas convencionais; Tcap – plantas conduzidas com capina; plantas tratadas com herbicida. Setas indicam 1,5Kb no marcador ladder 1Kb (Invitrogen)

Tabela 3 – Correlação entre as seqüências obtidas neste trabalho e seqüências do banco de dados do NCBI

Espécies com possível correlação nos bancos de dados do NCBI	Números de acesso	Número de clones e % de ocorrência	Similaridade entre seqüências relacionadas (%)	Seqüências com similaridade $\leq 95\%$
<i>Bullera globispora</i>	D31650	2 (3,2%)	95 – 99	1
<i>Coniothyrium minitans</i>	AY642526	1 (1,6%)	99	0
<i>Cryptococcus gastricus</i>	DQ645513	3 (4,8%)	90 – 98	2
<i>Cryptococcus dimennae</i>	AB032627	1 (1,6%)	98	0
<i>Cryptococcus humicola</i>	AB035587	1 (1,6%)	98	0
<i>Cryptococcus flavus</i>	AB032629	6 (9,7%)	97 – 98	0
<i>Phoma herbarum</i>	AY337712	1 (1,6%)	97	0
<i>Pulvinula archeri</i>	U62012	1 (1,6%)	97	0
<i>Rhodotorula lactosa</i>	D45366	2 (3,2%)	99	0
<i>Ustilago maydis</i>	X62396	18 (29%)	90 – 99	2
<i>Ustilago hordei</i>	U00973	3 (4,9%)	93 – 99	2
<i>Ustilago shiraiana</i>	AB028189	3 (4,9%)	90 – 99	1
Uncultured eukaryote A1.E028	AY046684	7 (11,3%)	95 – 99	1
Uncultured eukaryote A1.E017	AY046695	8 (12,9%)	94 – 99	2
Ausência de similaridade		5 (8,1%)		
TOTAL		62 (100%)		11

4.2.2 Análise filogenética

As seqüências do gene 18S do rDNA com maior similaridade com as encontradas no banco de dados do NCBI foram utilizadas para análise filogenética (Figura 9).

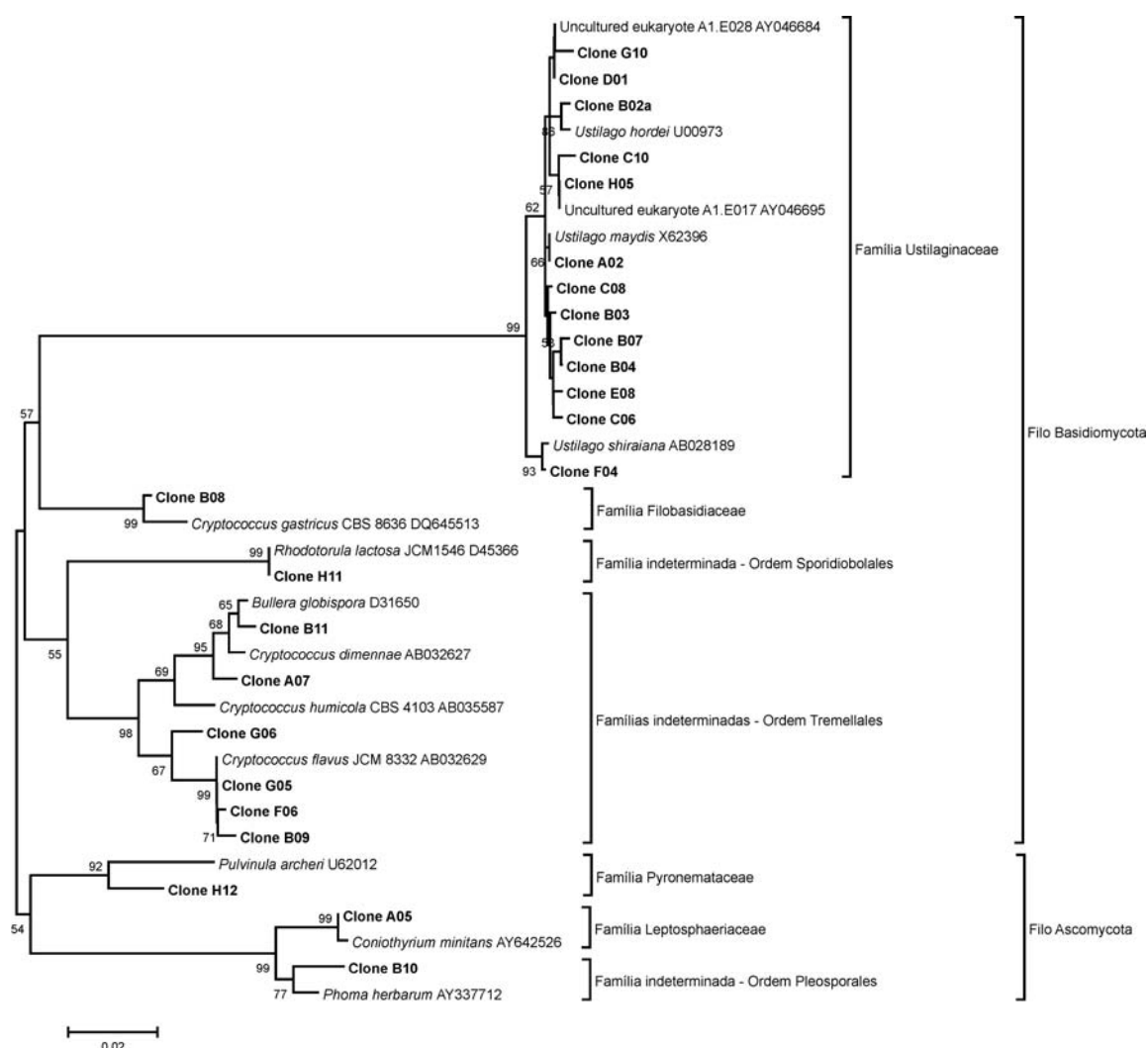


Figura 9 – Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as seqüências do gene 18S de 24 clones representativos da biblioteca metagenômica de fungos endofíticos de cana-de-açúcar. Como grupo externo foi utilizado a própria clade de ascomicetos. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* ($n=1000$ replicatas) $\geq 50\%$ estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.02 substituições por posição

As seqüências obtidas através da análise independente de cultivo demonstraram similaridade com seqüências de basidiomicetos de famílias ainda indeterminadas da ordem Sporidiobolales e da ordem Tremellales, e de representantes das famílias Ustilaginaceae e Filobasidiaceae.

Seqüências da família Ustilaginaceae incluíram representantes de eucariotos não cultiváveis e de espécies do gênero fitopatogênico *Ustilago*, como *Ustilago maydis* de milho, *Ustilago hordei* de aveia e trigo, e *Ustilago shiraiana* de bambu. Estes resultados são controversos, uma vez que estas espécies são altamente dependentes de seus hospedeiros e somente *Ustilago scitaminea* é reportado como patógeno de cana-de-açúcar. Entretanto, não existem seqüências do gene 18S de *U. scitaminea* nos bancos mundiais de seqüências, impossibilitando sua análise em conjunto com as seqüências obtidas neste trabalho. Piepenbring, Stoll e Oberwinkler (2002) analisando seqüências da subunidade maior do rDNA de *U. maydis*, *U. scitaminea* e *U. esculenta* constataram a alta similaridade entre *U. maydis* e *U. scitamineae* e entre estes e espécies do gênero *Sporisorium*. Estes autores sugeriram a reclassificação de *U. scitaminea* para *Sporisorium scitamineum*, baseados nas seqüências da subunidade maior e no trabalho prévio de Vánky (1991) que também sugerira esta mudança. Piepenbring, Stoll e Oberwinkler (2002) indicaram também a necessidade da inclusão de *U. maydis* dentro do gênero *Sporisorium*, entretanto a espécie *Sporisorium maydis* já existe, fato que exige mudanças mais complexas na nomenclatura. Provavelmente a alta similaridade observada para a subunidade maior do rDNA também exista para a subunidade menor, fato que justifica a presença do alinhamento das seqüências obtidas em cana-de-açúcar com seqüências de *U. maydis*.

Outro gênero bastante freqüente obtido nesta análise foi *Cryptococcus*, representado pelas espécies *Cryptococcus gastricus*, *Cryptococcus dimennae*, *Cryptococcus humicola* e *Cryptococcus flavus*. Este gênero, assim como os gêneros *Rhodotorula* e *Bullera* também observados neste estudo, é encontrado comumente como endófitos em tecidos de diversas plantas de ambientes temperados e tropicais (AZEVEDO et al., 2000; GLUSHAKOVA; CHERNOV, 2004; CAMATTI-SARTORI et al., 2005; GAO et al., 2005; AZEVEDO; ARAUJO, 2007), e como epifítico de folhas e colmos de cana-de-açúcar como previamente demonstrado por Azerezo et al. (1998).

Clones com seqüências similares aos ascomicetos *Coniothyrium minitans*, *Pulvinula archeri* e *Phoma herbarum* foram também encontrados. Os iniciadores EF3 e EF4 utilizados nesta análise amplificam preferencialmente basidiomicetos, mas não excluem a possibilidade de amplificação de seqüências de ascomicetos, fato que justifica a presença das seqüências de ascomicetos observadas.

5 DISCUSSÃO

O plantio de plantas geneticamente modificadas ainda é um assunto controverso devido o efeito indireto que elas podem apresentar sobre a composição e funcionalidade do ecossistema (DUNFIELD; GERMIDA, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, com base nas técnicas dependentes de cultivo, a comunidade de fungos endofíticos associada a plantas de cana-de-açúcar transgênicas resistentes ao herbicida imazapyr é diferente daquela associada a plantas convencionais. Os resultados de AMOVA e o índice de diversidade de Shannon demonstraram que as diferenças nas comunidades de fungos endofíticos estão relacionadas à aplicação do herbicida, presença do transgene e envelhecimento da planta. Conforme demonstrado por AMOVA, a aplicação do herbicida induziu mudanças rápidas e transientes na comunidade endofítica, enquanto que a transgenia induziu mudanças mais lentas que foram mantidas ao longo do tempo.

A análise dos fungos cultiváveis por ARDRA demonstrou a presença de 14 haplótipos diferentes, representados por 12 famílias do filo Ascomycota, conforme demonstrado pelo seqüenciamento da região ITS-1-5.8S-ITS2 do rDNA. As seqüências analisadas de cada haplótipo revelaram que a comunidade de fungos associados às folhas de cana-de-açúcar apresenta uma composição diversa, com a presença de gêneros que são comumente isolados como endófitos em regiões tropicais, como *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis* e *Xylaria* (ARNOLD et al., 2000; SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003; SANTAMARÍA; BAYMAN, 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005; AZEVEDO; ARAUJO, 2007). Isolados com seqüências similares a *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium subglutinans* também foram encontrados como endófitos de cana-de-açúcar. Tais espécies de *Fusarium* estão associadas à *Pokkah-boeng* e a podridão causada por *Fusarium* em cana-de-açúcar, podendo ocorrer como patógenos latentes, que sob condições de estresse podem manifestar a doença na planta (TAKESHI; RAGO, 2005).

A presença de basidiomicetos foi analisada através da técnica metagenômica independente de cultivo, que revelou a presença de gêneros relacionados às famílias Ustilaginaceae e Filobasidiaceae e as ordens Sporidiobolales e Tremellales. Embora

não tenha sido possível comparar os tratamentos de cana-de-açúcar através da técnica de metagenoma, os resultados referentes a esta análise permitiram demonstrar um pouco da diversidade de basidiomicetos presentes em folhas de cana-de-açúcar. Seqüências obtidas através da análise metagenômica possuíram alta similaridade com seqüências de espécies do gênero fitopatogênico *Ustilago*. Possivelmente estas seqüências são relacionadas à *Ustilago scitaminea*, o único patógeno deste gênero em cana-de-açúcar (TAKESHI; RAGO, 2005). A ausência de seqüências do gene 18S de *U. scitaminea* nos bancos de seqüências mundiais, fez com que as seqüências mais próximas encontradas fossem as de *U. maydis*, espécie altamente relacionada com *U. scitaminea*, conforme demonstrado por Piepenbring, Stoll e Oberwinkler (2002). As variedades, SP80-1842 (convencional) e IMI-01 (transgênica), utilizadas neste trabalho são tidas como resistentes a *U. scitaminea*, de modo que presença deste gênero nestas variedades pode representar riscos à cultura de cana-de-açúcar nacional, uma vez que foram reportadas recentemente quebras de resistência a *U. scitaminea* na Austrália (INTERNATIONAL PHYTOSANITARY PORTAL - IPP, 2006).

A análise metagenômica permitiu também identificar espécies de *Cryptococcus*, como *Cryptococcus gastricus*, *Cryptococcus dimennae*, *Cryptococcus humicola* e *Cryptococcus flavus*. Azerezo et al. (1998) estudando leveduras epifíticas de folhas de cana-de-açúcar demonstraram também a presença do gênero *Cryptococcus*, entretanto a única espécie encontrada em comum entre a comunidade epifítica observada por estes autores e a comunidade endofítica analisada neste trabalho foi *Cryptococcus humicola*. As seqüências de 18S também demonstraram a presença das espécies *Rhodotorula lactosa* e *Bullera globispora*. Azerezo et al. (1998) reportaram também *Rhodotorula lactosa* e *Bullera* sp. como leveduras epifíticas de cana-de-açúcar. A comparação entre a comunidade endofítica analisada neste trabalho e a epifítica observada por Azerezo et al. (1998) demonstra a existência de duas comunidades aparentemente diferentes que, apesar de possuírem espécies que ocorrem em ambas as comunidades, possuem espécies que em sua maioria estão relacionadas a uma comunidade ou outra. Um exemplo disto pode ser observado com as espécies de *Cryptococcus* isoladas como epifíticas por Azerezo et al. (1998) (*Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus hungaricus*, *Cryptococcus laurentii* e

Cryptococcus macerans) e isoladas como endofíticas neste trabalho (*Cryptococcus gastricus*, *Cryptococcus dimennae*, *Cryptococcus humicola* e *Cryptococcus flavus*).

A análise metagenômica revelou também a presença de três seqüências de ascomicetos. A baixa incidência de ascomicetos é relativa à amplificação preferencial de basidiomicetos pelos iniciadores EF3 e EF4, conforme observado por Smit et al. (1999).

Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com resultados demonstrados para outras comunidades associadas a plantas transgênicas, como comunidades bacterianas associadas às raízes e rizosfera de plantas de canola (*Brassica napus*) resistentes ao herbicida glifosato, transformadas com os genes glifosato oxidoreductase e enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase de *Agrobacterium* sp. (SICILIANO; GERMIDA, 1999; DUNFIELD; GERMIDA, 2001). As comunidades bacterianas associadas à rizosfera e raízes de *Brassica napus* geneticamente modificada demonstraram ser diferentes da comunidade bacteriana em plantas convencionais com base tanto na composição de ácidos graxos quanto nos perfis de utilização de carbono (DUNFIELD; GERMIDA, 2001). A comunidade bacteriana endofítica nas raízes desta planta também exibiu baixa diversidade comparada a comunidade bacteriana em seu cultivar convencional (SICILIANO; GERMIDA, 1999).

Os efeitos de plantas geneticamente modificadas foram também detectados em fungos micorrízicos arbusculares, um grupo de fungos fundamental para a fertilidade do solo e nutrição das plantas (TURRINI et al., 2004; CASTALDINI et al., 2005). Exudatos das raízes de plantas de milho *Bt* 176, expressando o gene *CryIAb* para a produção da toxina *Bt*, afetaram o desenvolvimento regular dos apressórios de *Glomus mosseae* (TURRINI et al., 2004). O milho *Bt* 176 e seus resíduos utilizados como fertilizantes afetaram também a comunidade de bactérias na rizosfera, a respiração no solo e o estabelecimento de associações com fungos micorrízicos do próprio ambiente (CASTALDINI et al., 2005).

Os resultados demonstrados aqui sugerem que tanto as plantas de cana-de-açúcar transgênicas quanto a aplicação do herbicida imazapyr afetaram determinados haplótipos da população endofítica, indicando a presença de alteração em grupos específicos da população. O herbicida imazapyr inibe a enzima AHAS, responsável pela

síntese dos aminoácidos essenciais isoleucina, leucina e valina. Esta enzima encontra-se presente em bactérias, fungos e plantas, apresentando seqüências de aminoácidos muito similares, fato que sugere a presença de um ancestral comum para esta enzima nos três grupos de organismos (PANG; DUGGLEBY, 1999). A alta similaridade entre as enzimas destes grupos permite a ação do herbicida sobre outros organismos que não somente as plantas daninhas. Fato que pode justificar a diferença observada para a constituição de haplótipos das plantas de cana-de-açúcar transgênicas tratadas com herbicida aos três meses (um mês após a aplicação do mesmo). De fato, como previamente demonstrado, os herbicidas derivados de imidazolinonas induzem alterações na coloração da colônia do fungo *Phomopsis amaranthicola*, e afetam fracamente sua germinação (WYSS et al., 2004). Os efeitos dos derivados de imidazolinonas também foram detectados induzindo a colonização do patógeno *Heterobasidion annosum* em caules de pinheiros (SEABY; SCHAIBLE, 2000). Solos contendo imazethapyr, outro derivado das imidazolinonas, demonstraram alterações tanto em suas biomassas microbianas quanto em suas propriedades bioquímicas, indicando que a presença de derivados de imidazolinonas não só afeta a população de microrganismos, como também afeta a funcionalidade do ambiente (Perucci et al., 2000). O fato de alguns grupos de microrganismos serem susceptíveis e outros serem resistentes ao efeito das imidazolinonas, está relacionado principalmente aos cinco sítios de mutação que conferem resistência a enzima AHAS, fato que, segundo Tranel e Wright (2002), aumentam a probabilidade das mutações atingirem algum dos cinco sítios e induzirem a resistência ao herbicida.

Poucos estudos foram realizados avaliando o efeito de plantas transgênicas sobre comunidades de fungos endofíticos, entretanto Lewis et al. (2001) avaliaram o efeito de plantas de milho *Bt* sobre a colonização do fungo endofítico entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Os resultados demonstraram não haver diferenças significativas nos níveis de endofitismo entre plantas transgênicas e convencionais. Por outro lado, Götz et al. (2006) demonstraram que as variedades de batata transgênica expressando lizozima T4 afetaram consideravelmente a comunidade de fungos e bactérias endofíticas associados às raízes.

De acordo com Liu et al (2005), as diferentes respostas observadas para as comunidades microbianas na presença de diferentes cultivares geneticamente modificados (ex. cana-de-açúcar, milho, beterraba etc.) podem ser relacionados às diferenças nos tratamentos com herbicidas, ao tipo de solo, aos produtos dos transgenes, ou ao efeito indireto nos processos de sinalização alterados pela inserção dos transgenes em locais indeterminados no genoma das plantas.

Os resultados apresentados neste trabalho representam o primeiro relato sobre a composição de fungos endofíticos associados a plantas de cana-de-açúcar e também representam um passo importante para o entendimento dos efeitos que plantas transgênicas e seu manejo podem induzir sobre a comunidade de fungos endofíticos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados demonstram que a comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar geneticamente modificada para a resistência ao herbicida imazapyr é diferente da associada à cana-de-açúcar convencional.

As variações observadas nas comunidades endofíticas estão relacionadas tanto ao cultivar transgênico quanto a aplicação do herbicida. Enquanto a aplicação do herbicida induziu mudanças rápidas e transientes na comunidade de fungos, as plantas transgênicas induziram mudanças mais lentas que foram mantidas ao longo do tempo.

O total de quatorze haplótipos de ARDRA foram observados na comunidade endofítica de cana-de-açúcar. O seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 revelou uma comunidade rica representada por doze famílias diferentes do filo Ascomycota. Muitos dos gêneros encontrados são comumente descritos como endófitos em plantas de clima tropical, como *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis* e *Xylaria*.

A análise independente de cultivo com base no gene 18S identificou a presença de gêneros relacionados às famílias Ustilaginaceae e Filobasidiaceae, e as ordens Sporidiobolales e Tremellales, todos pertencentes ao filo Basidiomycota.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. New York: John Wiley, 1996. 869p.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

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

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

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 145-180, 2000.

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

ARRUDA, M.C.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; MILLER, R.N.G.; RESENDE, M.L.V.; FELIPE, M.S.S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 25-37, 2003.

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

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

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 6, p. 189-207. In Press.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. Jr.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganism: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, n. 1, 2000. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/index.html>>. Acesso em: 2 mar. 2006.

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

BACON, C.W.; WHITE, J.F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: BACON, C.J.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 237-261.

BARELA, J. F. **Seletividade de herbicidas para a cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) afetada pela interação com nematicidas aplicados no plantio**. 2005. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BASTOS, E. **Cana-de-açúcar, o verde mar de energia**. São Paulo: Ed. Ícone, 1987. 130 p.

BERNSTEIN, M.E.; CARROL, C.G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 55, p. 644-653, 1977.

BING, L.A.; LEWIS, L.C. Occurrence of entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 45, p. 147-156, 1993.

BLANCO, H.G.; OLIVEIRA, D.A.; COLETI, J.T. Competição entre plantas daninhas e a cultura da cana-de-açúcar. II. Período de competição produzido por uma comunidade natural de mato, com predomínio de gramíneas, em culturas de ano. III. Influência da competição na nutrição da cana-de-açúcar. **Biológico**, São Paulo, v. 47, p. 77-88, 1981.

BROWN, K.B.; HYDE, K.D.; GUEST, D.I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 1, p. 27-51, 1998.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K. D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 943-948, 2001.

- CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; PAGNOCCA, F.C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J.L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 45, p. 397-402, 2006.
- CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host-preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, New York, v. 94, p. 210–220, 2002.
- CARVALHO, L.C.C. Cenário sucroalcooleiro – após a transição. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 17, p. 12-13, 1999.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDETTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; A. FABIANI; LANDI, S; SANTOMASSIMO, F; PIETRANGELI, B; NUTI, M.P; MICLAUS, N.; GIOVANNETTI, M. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 71, p. 6719-6729, 2005.
- CHANG, A.K.; DUGGLEBY, R.G. Herbicide-resistant forms of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase: characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. **The Biochemical Journal**, London, v. 333, p. 765-777, 1998.
- CHEN, D.M.; CAIRNEY, J.W. Investigating of the influence of prescribed burning on ITS profiles of ectomycorrhizal and others soil fungi at three Australian sclerophyll forest sites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 532-540, 2002.
- CHRISTENSEN, M.J.; BENNETT, R.J.; SCHMID, J. Growth of *Epichloë/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 93–106, 2002.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Controle de plantas daninhas na cultura de cana-de-açúcar através de herbicida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DAS PLANTAS DANINHAS, 10., 1997, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBPCD, 1997. p. 253.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, Tempe, v. 69, p. 10-16, 1988.
- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-15, 1990.
- DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 1–9, 2001.

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

EMBRAPA. **Agroecologia da cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>>. Acesso em 02 jan. 2005.

ESPINOSA-GARCIA, F.J.; LONGENHEIM, J.H. The leaf fungal endophytic community of a coastal red wood population – diversity and spatial patterns. **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, p. 89-98, 1990.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 479-491, 1992.

FAETH, S.H.; HAMMON, K.E. Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and association with leafminers. **Ecology**, Tempe, v. 78, p. 810-819, 1997.

FILION, M.; HAMELIN, R.C.; BERNIER, L.; St-ARNAUD, M. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with health and diseased Black Spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in nursery. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 70, p. 3541-3551, 2004.

FISHER, P.J. Survival and spread of the endophyte *Stagonospora pteridiicola* in *Pteridium aquilinum*, other ferns and some flowering plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 132, p. 119-122, 1996.

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

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

GAMBOA, M.A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, Den Haag, v. 156, p. 41-45, 2002.

GAO, X.; ZHOU, H.; XU, D.; YU, C.; CHEN, Y.; QU, L. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 255-266, 2005.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. 653 p.

GLUSHAKOVA, A.M.; CHERNOV, I.Y. Seasonal dynamics in a yeast population on leaves of the common wood sorrel *Oxalis acetosella* L. **Microbiology**, Reading, v. 73, p. 184–188, 2004.

GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; DRAEGER, H.S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, p. 1-10, 2006. In Press.

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

GUERRANTE, R.D.S. **Transgênicos**: uma visão estratégica. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 173 p.

HAILS, R.S. Genetically modified plants – the debate continues. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 15, p. 14–18, 2000.

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

HAWKSWORTH, D.L. The variety of fungal-algal symbiosis, their evolutionary significance, and the nature of lichens. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 96, p. 3-20, 1988.

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

HAWKSWORTH, D.L. How many fungi are there? **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 4-5, 2000.

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores de produtividade nacional**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lisa/lisa11200407.shtm>>. Acesso em: 11 jan. 2006.

INTERNATIONAL PHYTOSANITARY PORTAL. Disponível em: <https://www.ippc.int/IPP/En/news.jsp?ctn=nppo&displayMode=details&selected_year=2006> Acesso em: 10 set. 2006.

JAMES, C. Preview: global status of commercialized transgenic crops. **ISAAA Briefs**, Ithaca, n. 30, p. 1-30, 2005.

JUMPPONEN, A. Soil fungal community assembly in a primary successional glacier forefront ecosystem as inferred from rDNA sequence analysis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 158, p. 569-578, 2003.

KOWALCHUK, G.A.; BRUINSMA, M.; VAN VEEN, J.A. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 18, p. 403-410, 2003.

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

KREMER, R.J.; MEANS, N.E.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, New York, v. 85, p. 1165-1174, 2005.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, p. 150-163, 2004.

LANA, T.G. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso***. 2004. 91 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

LEGAULT, D.; DESSUREAULT, M.; LAFLAMME, G. Mycoflore dês aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa* l. Champignons endophytes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, p. 2053-2060, 1989.

LEWIS, L.C.; BRUCK, D.J.; GUNNARSON, R.D.; BIDNE, K.G. Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and non-transgenic corn. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1395-1400, 2001.

LIU, B.; ZENG, Q.; YAN, F.; XU, H.; XU, C. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 27, p. 1–13, 2005.

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

LORENZI, H. Plantas daninhas e seu controle na cultura da cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 1988, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: COOPERSUCAR, 1988. p. 281-301.

MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; LILBURN, T.G.; PARKER JR, C.T.; SAXMAN, P.R.; FARRIS, R.J.; GARRITY, G.M.; OLSEN, G.J.; SCHMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M. The RDP-II (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, p. 173–174, 2001.

MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. New Jersey: Princeton University Press, 1988. 179 p.

MALLORY-SMITH, C.A.; RETZINGER, E.L. Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. **Weed Technology**, Champaign, v. 17, p. 605–619, 2003.

MARGALEF, R. Homage to Evelyn Hutchinson or why is there an upper limit to diversity. **Arts and Science**, Washington, v. 44, p. 211-235, 1972.

MARTINS, M.K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110 p. Tese (Doutor em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MAULE, R.F.; MAZZA, J.A.; MARTHA, G.B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 295-301, 2001.

MAZUR B.J.; CHUI, C.; SMITH, J.K. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 85, p. 1110-1117, 1987.

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

NOVARETTI, W.R.T. **Efeitos de diferentes níveis de populações iniciais de *Meloidogyne javanica* em duas variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas no Estado de São Paulo**. 1981. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) — Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.

OLIVEIRA, V.C.; COSTA, J.L.S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 631-634, 2002.

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

PANG, S.S.; DUGGLEBY, R.G.; GUDDAT, L.W. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 317, p. 249-262, 2002.

PERFECT, T.J. Biodiversity and tropical pest management. In: HAWKSWORTH, D.L. (Ed.). **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture**. London: CAB International, 1994. p.169-174.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWA, J.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 179–197.

PETRINI, O. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In: REDLIN, S.C.; CARRIS, L.M. (Ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St Paul: American Phytopathological Society Press, 1996. p.87–100.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROL, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, p. 789-796, 1982.

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

PIEPENBRING, M.; STOLL, M.; OBERWINKLER, F. The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea*, and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). **Mycological Progress**, Tübingen, v. 1, p. 71-80, 2002.

PIMENTEL, I.C. **Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas**. 2001. 154 p. Tese (Doutor em Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

PIMENTEL, I.C.; KUCZKOWSKI, F.R.; CHIME, M.A.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI Jr., A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, Curitiba, v. 36, p. 123-128, 2006.

PITELLI, R. A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informações Agropecuárias**, Belo Horizonte, v. 11, p. 16-27, 1985.

PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; VARGAS, L.; FERREIRA, F.A. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. Viçosa: Suprema, 2003. 150 p.

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

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

RICHARDS, T.A.; BASS, D. Molecular screening of free-living microbial eukaryotes: diversity and distribution using a meta-analysis. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 240-252, 2005.

RODRIGUEZ, K.F. The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, New York, v. 86, p. 376-385, 1994.

RODRIGUEZ, K.F.; SAMUELS, G.J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, p. 827-830, 1990.

ROGERS, J.D. Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 1412-1420, 2000.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MacNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG,

C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 66, p. 2541-2547, 2000.

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

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 275-280, 2004.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 1-8, 2005.

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

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

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

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

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

SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 263-272, 1999.

SICILIANO, S. D.; THEORET, C. M.; De FREITAS, J. R.; HUCL, P. J.; GERMIDA, J. J. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 844-851, 1998.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; DIRK Van ELSAS, J.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing PCR-amplified genes encoding 18S-rRNA genes and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 65, p. 2614-2621, 1999.

STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes** New York: Marcel Dekker, 2000. p. 3-30.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 535-534, 2003.

STROBEL, G.A.; DIRKSIE, F.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

SURYANARAYANAN, T.S., VENKATESAN, G., MURALI, T.S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**, Bangalore, v. 85, p. 489-493, 2003.

SZMRECSANYI, T.; MOREIRA, E.P. O desenvolvimento da agroindústria canieira do Brasil desde a Segunda Guerra Mundial. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 5, n. 11, p. 57-79, 1991.

TAKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KITAMI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**, São Paulo: Ceres, 2005. p. 185-196.

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

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

THIOULOUSE, J.; CHESSEL D.; DOLÉDEC, S.; OLIVIER, J.M. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. **Statistics and Computing**, Hingham, v. 7, p. 75-83, 1997.

TRANDEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Champaign, v. 50, p. 700-712, 2002.

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

VANEECHOUTTE, M.; ROSSAU, R.; DeVOS, P.; GILLIS, M.; JANSSENS, D.; PAEPE, N.; DeROUCK, A.; FIERS, T.; CLAEYS, G.; KERSTERS, K. Rapid identification of bacteria in the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 93, p. 227-234, 1992.

VÁNKY, K. Taxonomical studies on Ustilaginales. VIII. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 41, p. 483-495, 1991.

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

WANDERKOORNHUYSE, P.; BALDAUF, C.L.; STRACZEK, J.; YOUNG, J.P. Extensive fungal diversity in plant roots. **Science**, Washington, v. 295, p. 2051, 2002.

WHITE, J.F.; REDDY, P.V.; BACON, C.W. Biotrophic endophytes of grasses: a systemic appraisal. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 49-62.

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

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