

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

**Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar
(*Saccharum officinarum*, L.)**

Léia Cecília de Lima Fávaro

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

**Piracicaba
2009**

Léia Cecília de Lima Fávaro
Bióloga

Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar
(*Saccharum officinarum*, L.)

Orientador:
Prof. Dr. WELINGTON LUIZ DE ARAÚJO

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

Piracicaba
2009

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

Fávaro, Léia Cecília de Lima

Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) / Léia Cecília de Lima Fávaro - - Piracicaba, 2009.
291 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Agentes antimicrobianos 2. Cana-de-Açúcar 3. Controle biológico 4. Fitopatógenos
5. Fungos fitopatogênicos 6. Marcador molecular 7. Variação genética I. Título

CDD 633.61
F272d

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

*Ao meu pai, Urbano, e aos meus
irmãos, Lilian e Fernando
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Welington Luiz de Araújo, por ter aceitado ser meu orientador neste doutorado, pela amizade, estímulo constante e pela liberdade concedida para execução deste trabalho. Toda a ajuda concedida e o exemplo de profissionalismo e relação interpessoal com certeza marcaram a minha formação nos anos passados em Piracicaba.

Ao CNPq pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

À Professora Aline A. Pizzirani-Kleiner, por ter me recebido no laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP e pela oportunidade de realização do estágio em docência, agradeço sinceramente.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), especialmente à Dra. Sabrina Moutinho Chábregas, pela disponibilização das plantas de cana-de-açúcar utilizadas neste trabalho, e pelas valiosas sugestões durante a realização do exame de qualificação.

Ao Professor Carlos Alberto Labate pela disponibilização das linhagens desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens*, e pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação.

A Dra. Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália) pela disponibilização do vetor de transformação de fungos utilizado neste trabalho.

Especial agradecimento à Professora Anita Jocelyne Marsaioli (Instituto de Química, Unicamp) pela colaboração e disponibilização das facilidades de seu laboratório para a realização das análises bioquímicas dos fungos. Um agradecimento mais que especial a Diana da Silva Araújo e a Cíntia Milagre pela ajuda nas extrações dos metabólitos secundários e análises bioquímicas dos fungos, e também pelos ótimos momentos passados em Campinas.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes, do laboratório de Genética de Leveduras/Esalq, por toda ajuda concedida durante os 4 anos de doutorado, em especial a disponibilização do rotaevaporador para análise dos extratos orgânicos.

À Dra. Mônica Labate e à Fernanda Salvato, do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas/Esalq, pela ajuda e pela utilização dos equipamentos do laboratório.

À todos os colegas do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas/Esalq, em especial à Dra. Salete Gaziola, pela disponibilização das centrífugas durante todo o período de execução desse trabalho.

As secretárias Léia e Neusa, e aos funcionários Fernando, Valdir e Carlinhos pela ajuda sempre presente.

Agradecimento especial às amigas de casa (e da vida!) Marise Susuki, Priscila Rosseto, Sueli Rodrigues e Paula Fabiane Martins, pela ajuda durante os meses de pé engessado, pela ótima convivência, amizade e boas risadas. Agradecimento especial a Michele Silva, pelas caronas e viagens (sempre com muita emoção!) de volta para Londrina.

Agradecimento especial também a Aline Silva Romão e Francisco Andreotte por toda ajuda na execução do AFLP, quando estava com o pé quebrado (lembrei desse detalhe!) vocês foram imprescindíveis para realização dessas análises.

À Anderson Ferreira, pelo auxílio nas análises de microscopia de fluorescência.

À Fernanda Sebastianes, pela ajuda com as extrações dos metabólitos dos fungos, meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Joelma Marcon, por toda ajuda com os isolamentos (eternos isolamentos) de cana-de-açúcar, e pelos anos de convivência no Laboratório de Genética de Microrganismos.

Especial agradecimento à pesquisadora e cientista e amiga Maria Carolina Quecine, por toda ajuda com o *Southern Blot*, e pela enriquecedora e divertida convivência durante os anos passados no Laboratório de Genética de Microrganismos.

Ao pesquisador e cientista Carlos Aguilar pela ajuda com as análises estatísticas, e pelas valiosas sugestões e críticas construtivas durante a realização deste trabalho. À Armando Cavalcante Dias e ao Carlos Aguilar, pelos momentos de descontração durante as “horas extras” de trabalho.

Às sempre amigas Karen Marcucci e Janáina Orlandi, pelos momentos de descontração nas voltas para Londrina e por sempre estarem presentes.

Agradeço de modo especial também a todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos Prof^o. João Lúcio de Azevedo (Departamento de Genética, Esalq/USP), muitos que já passaram pelo laboratório e hoje são profissionais em diferentes instituições, e aos amigos contemporâneos: aos Professores João Lúcio de Azevedo e Aline Pizzirani-Kleiner, à Ágata, Mayra, Cristina Maki, Joelma, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Fernando, Paulo Lacava, Manuella, Michele, Andréa, Marise, Renata, Priscila, Aline, Maria Carolina, Uirá, Anderson, Francisco, Armando, Carlos, Viviane, Fernanda Bernardes, Fernanda Sebastianes, Maria Beatriz, Ana Paula, Danice, Sarina, Mariele, Cris e ao grande Zezo, pela amizade, pela enriquecedora convivência, pelo aprendizado e orientação, pelas consultorias de bancada e ótimo clima de trabalho. Posso dizer que não fiz somente o doutorado, mas fiz muitos amigos para a vida inteira.

À Fernando Lucas de Melo, pela sinceridade e sensibilidade, pela convivência de todos estes anos, apoio incondicional, por ser minha maior conquista e por me fazer querer enxergar além das lentes do microscópio e além dos limites das placas de Petri, agradeço com amor. E claro, não podia deixar de agradecer pelas sugestões e toda ajuda com as análises filogenéticas.

À minha família pelo apoio constante e incentivo, ao meu Pai, Urbano, e aos meus irmãos, Lílian e Fernando.

À todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Porque a cabeça da gente é uma só, e as coisas que há e que estão para haver são demais de muitas, muito maiores diferentes, e a gente tem de necessitar de aumentar a cabeça, para o total.”

João Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas)

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Revisão da literatura.....	20
1.1.1 Microrganismos endofíticos.....	20
1.1.2 Interações entre fungos endofíticos e plantas.....	24
1.1.2.1 Aspectos gerais.....	24
1.1.2.2 Interações entre fungos endofíticos e plantas ao nível celular e molecular.....	29
1.1.3 Algumas ferramentas que têm facilitado o estudo da interação fungo-planta.....	34
1.1.3.1 Transformação de fungos mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	34
1.1.3.2 Utilização de proteínas autofluorescentes no estudo da interação fungo-planta.....	42
1.1.4 O fungo <i>Epicoccum nigrum</i>.....	44
Referências.....	46
2 DIFERENCIAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR	
<i>Epicoccum nigrum</i> POR MEIO DE ABORDAGEM POLIFÁSICA.....	79
Resumo.....	79
Abstract.....	81
2.1 Introdução.....	83
2.2 Desenvolvimento.....	87
2.2.1 Material e Métodos.....	87
2.2.1.1 Isolamento de <i>Epicoccum</i> de folhas e raízes de cana-de-açúcar.....	87
2.2.1.2 Linhagens e condições de cultivo.....	88
2.2.1.3 Caracterização molecular de isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i>.....	91
2.2.1.3.1 Extração e manipulação de DNA genômico.....	91
2.2.1.3.2 Amplificação das regiões ITS1-5,8S-ITS2 e IGS do DNA ribossômico e do gene β-tubulina.....	91
2.2.1.3.3 Purificação de produtos de PCR e seqüenciamento de DNA.....	92
2.2.1.3.4 Análise filogenética baseada nas seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico e do gene β-tubulina.....	92

2.2.1.3.5 Estimativa do tempo de divergência entre linhagens endofíticas de <i>Epicoccum</i>	95
2.2.1.3.6 Análise de isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i> por meio de marcadores AFLP.....	95
2.2.1.3.6.1 Análise dos dados de marcadores AFLP.....	96
2.2.1.3.7 Análise de isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i> por meio de PCR-RFLP de genes ribossômicos.....	97
2.2.1.3.7.1 Análise de restrição da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico.....	97
2.2.1.3.7.2 Análise de restrição da região espaçadora intergênica (IGS) do DNA ribossômico.....	97
2.2.1.3.8 Análise filogenética dos dados combinados de <i>fingerprint</i> e seqüências de DNA.....	97
2.2.1.4 Testes de compatibilidade micelial.....	98
2.2.1.5 Caracterização cultural e morfológica de isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i>	98
2.2.1.5.1 Crescimento micelial em diferentes meios de cultura.....	98
2.2.1.5.2 Caracterização quanto à topografia e coloração das colônias.....	99
2.2.1.5.3 Caracterização quanto às dimensões dos conídios.....	99
2.2.1.6 Caracterização fisiológica de isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i> de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros.....	100
2.2.1.6.1 Secreção de enzimas hidrolíticas em meio sólido.....	100
2.2.2 Resultados e discussões.....	101
2.2.2.1 Análise filogenética baseada nas seqüências das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico e do gene β -tubulina.....	101
2.2.2.2 Análise de isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i> por meio de marcadores AFLP.....	107
2.2.2.3 Aplicação de PCR-RFLP de genes ribossômicos para rápida diferenciação de <i>Epicoccum</i> e comparação aos dados de marcadores AFLP.....	114
2.2.2.4 Análise filogenética dos dados combinados de <i>fingerprint</i> e seqüências de DNA.....	120
2.2.2.5 Reações miceliais entre isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i>	122
2.2.2.6 Caracterização cultural e morfológica de isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i> de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros.....	127
2.2.2.7 Abordagem fisiológica: secreção de enzimas hidrolíticas por isolados	

endofíticos de <i>Epicoccum</i> de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros.....	136
Referências.....	143
3 TRANSFORMAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO <i>Epicoccum nigrum</i>	
MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> E ANÁLISE DA INTERAÇÃO	
COM CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum officinarum</i>).....	159
Resumo.....	159
Abstract.....	161
3.1 Introdução.....	163
3.2 Desenvolvimento.....	167
3.2.1 Material e Métodos.....	167
3.2.1.1 Linhagens, vetor de transformação e condições de cultivo.	167
3.2.1.2 Teste de sensibilidade a higromicina B.....	169
3.2.1.3 Obtenção e preparo dos conídios.....	169
3.2.1.4 Transformação mediada por <i>A. tumefaciens</i>	169
3.2.1.5 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF)	171
3.2.1.6 Análise da estabilidade dos transformantes.....	171
3.2.1.7 Confirmação da transformação por PCR de colônia.....	172
3.2.1.8 Extração de DNA e análise de <i>Southern Blot</i>	173
3.2.1.9 Amplificação, clonagem e seqüenciamento das regiões que	
flanqueiam o T-DNA.....	174
3.2.1.10 Interação entre <i>E. nigrum</i> e plantas de cana-de-açúcar.....	175
3.2.1.10.1 Análise da germinação de conídios de <i>E. nigrum</i> e colonização de fragmentos	
foliares de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	175
3.2.1.10.2 Análise <i>in vitro</i> da interação de <i>E. nigrum</i> expressando GFP	
com plantas de cana-de-açúcar por microscopia óptica de fluorescência (MOF).....	176
3.2.1.10.3 Inoculação de <i>E. nigrum</i> selvagem e transformante em casa de	
vegetação e análise da interação por meio de reisolamento	177
3.2.1.10.3.1 Preparo do inóculo e montagem dos experimentos em casa de vegetação.....	177
3.2.1.10.3.2 Reisolamento de <i>E. nigrum</i> de plantas de cana-de-açúcar.....	178
3.2.1.10.3.3 Confirmação da identidade dos reisolados de <i>E. nigrum</i>	179

3.2.1.10.4 Efeito da inoculação das linhagens selvagem e transformada de <i>E. nigrum</i> sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação.....	180
3.2.2 Resultados e Discussões.....	180
3.2.2.1 Sensibilidade a higromicina B.....	180
3.2.2.2 Transformação de <i>E.nigrum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	181
3.2.2.3 Adequação das condições de transformação mediada por <i>A. tumefaciens</i>	182
3.2.2.3.1 Efeito da linhagem de <i>A. tumefaciens</i>	183
3.2.2.3.2 Efeito de diferentes parâmetros do co-cultivo sobre a eficiência de transformação.....	184
3.2.2.4 Análise dos transformantes quanto à estabilidade mitótica e expressão de GFP	187
3.2.2.5 Confirmação da transformação por PCR e análise de <i>Southern Blot</i>	190
3.2.2.6 Análise das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA.....	193
3.2.2.7 Interação de <i>E. nigrum</i> com cana-de-açúcar: análise por microscopia.....	196
3.2.2.8 Interação de <i>E. nigrum</i> com cana-de-açúcar: análise por meio de reisolamento.....	201
3.2.2.9 Interação de <i>E. nigrum</i> com cana-de-açúcar: efeito da colonização de <i>E. nigrum</i> sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação.....	210
Referências.....	214
4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Epicoccum</i> spp. E MUTAGÊNESE INSERCIONAL ALEATÓRIA MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	233
Resumo.....	233
Abstract.....	235
4.1 Introdução.....	237
4.2 Desenvolvimento.....	241
4.2.1 Material e Métodos.....	241
4.2.1.1 Linhagens e condições de cultivo.....	241
4.2.1.2 Ensaio de antagonismo contra fungos fitopatogênicos.....	241
4.2.1.3 Ensaio de antagonismo contra bactérias e leveduras patogênicas.....	244
4.2.1.3.1 Metodologia de blocos de ágar, modificada de Ichikawa et al. (1971).....	244
4.2.1.3.2 Metodologia de difusão em ágar, modificada de Spelhaug e Harlander (1989)....	245

4.2.1.4 Crescimento das linhagens endofíticas de <i>Epicoccum</i> em cultura submersa e obtenção dos extratos orgânicos em pequena escala.....	245
4.2.1.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de linhagens endofíticas de <i>Epicoccum</i> obtidos em pequena escala.....	246
4.2.1.5 Cultivo em grande escala, determinação do perfil cromatográfico e bioautografia.....	247
4.2.1.6 Comparação dos dados fenotípicos de atividade antimicrobiana com os dados genotípicos de marcadores AFLP e seqüências de ITS.....	249
4.2.1.7 Mutagênese insercional mediada por <i>A. tumefaciens</i> visando à identificação de genes envolvidos na produção de metabólitos antimicrobianos.....	250
4.2.1.7.1 Caracterização fenotípica da biblioteca de transformantes obtidos por transferência gênica mediada por <i>A. tumefaciens</i>	250
4.2.1.7.2 Análise molecular dos transformantes que perderam a capacidade antagonista contra microrganismos patogênicos.....	251
4.2.1.7.2.1 Extração de DNA genômico, confirmação da transformação por PCR e análise de <i>Southern blot</i>	251
4.2.1.7.2.2 Amplificação, clonagem e seqüenciamento das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA.....	252
4.2.1.7.3 Análise química dos transformantes que perderam a capacidade antagonista contra microrganismos patogênicos.....	253
4.2.1.7.3.1 Obtenção dos extratos orgânicos e bioautografia.....	253
4.2.2 Resultados e discussões.....	254
4.2.2.1 Atividade antifúngica e antibacteriana de isolados endofíticos de <i>Epicoccum</i>	254
4.2.2.2 Atividade biológica de extratos orgânicos de linhagens endofíticas de <i>Epicoccum</i> ..	262
4.2.2.3 Variabilidade da atividade antimicrobiana de linhagens endofíticas de <i>Epicoccum</i> e comparação com a variação genética.....	268
4.2.2.4 Mutagênese insercional mediada por <i>A. tumefaciens</i> e caracterização da biblioteca de agrotransformantes.....	272
4.2.2.5 Análise dos transformantes não inibidores e identificação das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA por TAIL-PCR.....	275
Referências.....	282

RESUMO

Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.)

O estudo de fungos endofíticos tem sido intensificado nos últimos anos e abrange principalmente a descrição de novas espécies, o potencial de utilização no controle biológico de fitopatógenos e a produção de metabólitos secundários com atividades biológicas diversas. No entanto, a interação e a possível função destes organismos em plantas de clima tropical são pobremente estudadas e pouco compreendidas. A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil e nos últimos anos está recebendo especial atenção devido à produção de etanol para uso como biocombustível. Um grande avanço no conhecimento das comunidades microbianas endofíticas desta planta tem sido alcançado, abrindo a possibilidade de estudo sobre as funções destes organismos na interação endofítica, bem como de seu potencial biotecnológico. Uma espécie que coloniza consistentemente os tecidos de cana-de-açúcar é o fungo *Epicoccum nigrum*. Este fungo é conhecido por sua atividade de biocontrole de fitopatógenos e por apresentar metabolismo secundário altamente desenvolvido e diverso. Nesse contexto, este trabalho teve por objetivos: 1) estudar a diversidade genética de isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros; 2) desenvolver um sistema de transferência de genes repórteres, visando à análise da interação *in vitro* e *in vivo* com cana-de-açúcar; 3) avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de isolados endofíticos de *Epicoccum* contra diferentes fitopatógenos e patógenos humanos; 4) obter mutantes insercionais com atividade antimicrobiana ausente, visando à identificação de genes envolvidos no metabolismo secundário. O trabalho foi iniciado com o isolamento de *Epicoccum* de cana-de-açúcar. A análise por meio de abordagem polifásica resultou na separação dos isolados em dois taxa distintos (Grupo 1, *E. nigrum*; Grupo 2, *Epicoccum* sp.), demonstrando que a classificação de *E. nigrum* como uma única espécie variável deve ser reavaliada. A seguir, transformantes resistentes a higromicina B e expressando GFP foram obtidos por meio de transferência gênica mediada por *A. tumefaciens*. Ensaio de colonização de cana-de-açúcar *in vitro* e *in vivo* com a linhagem selvagem e transformada demonstraram a natureza não patogênica das linhagens e que *E. nigrum* é capaz de colonizar endofiticamente e persistir nas folhas desta planta. A análise da atividade antimicrobiana revelou extensa variação fisiológica, a qual foi correlacionada com a variabilidade genética dos isolados. Uma biblioteca de agrotransformantes de *E. nigrum* e *Epicoccum* sp. foi caracterizada quanto à perda da atividade antimicrobiana. A análise das seqüências flanqueadoras do T-DNA obtidas por TAIL-PCR a partir dos mutantes revelou que a inserção ocorreu em diferentes locais do genoma, muitos com elevada similaridade com proteínas hipotéticas de fungos, algumas sem função conhecida, e outras contendo domínios conservados envolvidos em diferentes funções celulares, como regulação da expressão gênica, transporte, obtenção de energia e outras funções enzimáticas. A análise do extrato orgânico por meio de bioautografia revelou a perda da atividade antimicrobiana de alguns mutantes insercionais, em comparação ao extrato da linhagem selvagem. O grande número de mutantes obtidos e caracterizados constitui uma ferramenta importante para o estudo molecular do metabolismo secundário deste fungo endofítico, auxiliando o entendimento da biossíntese de diversos compostos com estruturas complexas produzidos por esta espécie.

Palavras-chave: Endofítico; Antagonismo; Metabólitos secundários; Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*; AFLP; ITS; β -tubulina; IGS-RFLP; Variabilidade genética

ABSTRACT

Diversity and interaction between *Epicoccum* spp. and sugarcane (*Saccharum officinarum*, L.)

The study of endophytic fungi has increased in last few years and includes mainly the description of new species, biological control and production of compounds with biological activity. However, due the fact that few studies have been done, the role of these microorganisms inside the host plant from tropical areas is poorly understood. Sugarcane is one of the most important crop in Brazil, mainly due the biofuel production. Therefore, studies have been done to better understanding the role of endophytic microbial diversity inside the sugarcane plants, allowing the possibility to use this interaction in sugarcane production and also find endophytic isolates with biotechnological potential. Previous studies have shown that an important sugarcane endophytic fungus is *Epicoccum nigrum*, which species has been associated to biological control of many phytopathogens and also production of different secondary metabolites. In this way, the aims of the present study were to 1) study the genetic diversity of sugarcane endophytic *Epicoccum*; 2) develop a genetic transformation system for *Epicoccum* spp., allowing the *in vitro* and *in vivo* study of the interaction with sugarcane; 3) evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of *Epicoccum*; 4) obtain mutants defective to antimicrobial activity and identification of genes associated to this activity. The polyphasic approach indicated that the evaluated *Epicoccum* population present two different genotypes (Group 1: *E. nigrum* and Group 2: *Epicoccum* sp.), suggesting that the classification of *E. nigrum* in only one species should be revised. Mutants resistant to hygromycin B and expressing GFP gene were obtained by transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. *In vitro* and *in vivo* sugarcane colonization showed that the *Epicoccum* isolates and mutants were able to settling endophytically inside sugarcane without induce disease symptoms, and live up to leaves. The results shown that the antimicrobial activity was related to genetic variability, and this activity was better characterized by analysis of a obtained mutant library of *E. nigrum* and *Epicoccum* sp. The TAIL-PCR analysis revealed that the T-DNA introduced into the mutants was inserted in different regions of the fungi genome, truncating different genes those coding fungi hypothetical proteins, conserved domain associated to cellular function, such as genetic regulation, energy obtaining and others enzymatic activity. The analysis by bioautography indicated that some mutants lose the antimicrobial activity, allowing the correlation between the truncated genes and antimicrobial compound production. The evaluation of this mutant library showed that different genes are associated to antimicrobial compound production and may be an important tools to study the secondary metabolism in this endophytic fungus, allowing the understanding of biochemical pathway associated to biosynthesis of complex molecules produced by this fungus.

Keywords: Endophyte; Antagonism; Secondary metabolites; Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*; AFLP; ITS; β -tubulina; IGS-RFLP; Genetic variability

1 INTRODUÇÃO

O estudo de fungos endofíticos é de interesse tanto do ponto de vista da pesquisa básica quanto aplicada. Estes microrganismos habitam a planta hospedeira sem induzirem sintomas de doença e seu estudo tem levado a descrição de novas espécies, e também de novos fenômenos e processos biológicos que ocorrem durante a interação com a planta e que estão relacionados aos efeitos bioprotetores conferidos por estes organismos. Além disso, o potencial dos fungos endofíticos para produção de compostos bioativos tem merecido cada vez mais destaque. Numerosos compostos novos com atividades biológicas diversas com aplicação na agricultura, indústria e medicina são continuamente isolados a partir de fungos endofíticos. No entanto, a interação destes organismos com a planta hospedeira bem como sua possível função na simbiose é pobremente estudada em ambientes de clima tropical.

Na tentativa de alcançar maior entendimento da interação endofítica nas condições tropicais, recentemente um grande avanço no conhecimento sobre as comunidades microbianas da filosfera e rizosfera de cana-de-açúcar tem sido obtido, abrindo a possibilidade de pesquisa sobre as funções destes organismos na planta hospedeira e sobre seu potencial biotecnológico. Esse é o caso do fungo *Epicoccum nigrum*, espécie estudada neste trabalho, a qual é conhecida não somente por apresentar capacidade de biocontrole de fitopatógenos, mas também pelo seu metabolismo secundário altamente desenvolvido e diverso. Apesar do potencial biotecnológico, a interação endofítica e as funções desse fungo em plantas de clima tropical não são conhecidas.

Em função disso, e também por ser uma das espécies de fungos frequentemente isolada como endofítica dos tecidos de cana-de-açúcar, tanto abordagens do ponto de vista da investigação básica e aplicada foram utilizadas neste trabalho para melhor compreensão da biologia da interação deste fungo com cana-de-açúcar. Nesse contexto, do ponto de vista da pesquisa básica, os objetivos principais deste trabalho foram investigar a diversidade genética e fisiológica dessa espécie em associação com cana-de-açúcar e desenvolver um sistema de transferência de genes que permitisse a expressão da proteína verde fluorescente (GFP) para visualização do fungo no tecido hospedeiro. Do ponto de vista da pesquisa aplicada, um outro objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade antimicrobiana de isolados endofíticos de *Epicoccum* e iniciar um estudo molecular visando à identificação de genes envolvidos no metabolismo secundário deste fungo. Nesse contexto, o capítulo 2 desta tese relata o isolamento e

uma extensa caracterização molecular, fisiológica e morfológica de diferentes isolados endofíticos de *Epicoccum* e discute a importância de uma abordagem polifásica no estudo das relações entre fungos e para descrição de novas espécies de fungos. Além de acessar a variabilidade genética e as relações entre isolados, este trabalho estudou a interação deste fungo com cana-de-açúcar *in vitro* e *in vivo*. Esta interação é apresentada no capítulo 3, no qual a adequação de uma metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foi realizada, permitindo a transferência do gene *gfp* e a visualização do fungo no tecido hospedeiro. Do ponto de vista aplicado, o último capítulo investiga a variação da capacidade antimicrobiana de isolados endofíticos de *Epicoccum* em comparação com a variabilidade genética, e descreve a obtenção e caracterização bioquímica preliminar de mutantes insercionais que perderam a atividade antimicrobiana, contribuindo para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese de metabólitos de interesse.

Para contextualização do tema de estudo, este primeiro capítulo relata a revisão bibliográfica a qual abrange os aspectos gerais que permeiam o estudo de fungos endofíticos, os avanços que têm sido alcançados, bem como uma visão geral das principais metodologias utilizadas para realização deste trabalho.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Microrganismos endofíticos

As plantas podem ser consideradas como sendo um microecossistema complexo onde diferentes nichos são explorados por uma variedade de microrganismos. Estes nichos incluem as superfícies externas da planta bem como os tecidos internos, nos quais diferentes microrganismos, como fungos, bactérias e arqueias, podem coexistir. O habitat associado às plantas é um ambiente dinâmico no qual muitos fatores podem afetar a estrutura e a composição de espécies das comunidades microbianas que colonizam os tecidos vegetais. Alguns destes fatores incluem mudanças sazonais, tipo de tecido vegetal e estágio de desenvolvimento da planta (MOCALI et al., 2003; KUKLINSKI-SOBRAL et al., 2004), espécie vegetal, diferentes cultivares e tipo de solo (DALMASTRI et al., 1999; KUKLINSKI-SOBRAL et al., 2004) e a interação com outros microrganismos benéficos ou patogênicos (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002a; LACAVA et al., 2004).

A capacidade de formar associações mutualistas com microrganismos é uma das estratégias bem sucedidas que as plantas evoluíram para adaptação a diferentes estresses abióticos e bióticos existentes no ambiente terrestre (TANAKA et al., 2006; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). As relações mutualistas mais estudadas são as associações entre as raízes de plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio e formadoras de nódulos e entre fungos micorrízicos arbusculares e centenas de espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas, abrangendo mais de 80% das espécies de plantas terrestres (PARNISKE, 2008; DEAKIN; BROUGHTON, 2009). Bem menos conhecidas, mas igualmente importantes devido aos efeitos bioprotetores, são as simbioses entre plantas e os chamados microrganismos endofíticos.

Muitas definições foram propostas para o termo endofítico, por exemplo, Petrini (1991) estudou principalmente fungos e definiu endófitos como microrganismos que habitam, pelo menos por um período do seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente. O termo “microrganismo endofítico” foi recentemente definido por Azevedo e Araújo (2007) e abrange todos aqueles microrganismos que podem ou não crescer em meio de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais. Esta definição não inclui os formadores de nódulos, como bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, nem os fungos micorrízicos. Dessa maneira, Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição deste conceito, dividindo os endófitos em dois tipos, sendo: a) Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta e; b) Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. É importante salientar que a distinção entre endófitos, epífitos (aqueles que vivem sobre a superfície) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças) é considerada de caráter didático. Tais relações representam um gradiente de interações (parasitismo-comensalismo-mutualismo) que depende não somente da adaptação e especificidade a um hospedeiro, mas também do estágio de desenvolvimento das partes envolvidas, da virulência inata do microrganismo, das respostas de defesa da planta e das condições ambientais que permeiam a interação (AZEVEDO et al., 2000; SCHULZ; BOYLE, 2005).

O estudo de microrganismos endofíticos do tipo I tem alcançado cada vez mais destaque especialmente pelos efeitos bioprotetores conferidos às plantas e por constituírem um nicho considerado profícuo para descoberta de novos compostos com diferentes atividades biológicas, bem como de novas espécies microbianas. Esta área de pesquisa pode ser considerada em plena expansão uma vez que de aproximadamente 300.000 espécies de plantas que existem na terra,

cada planta é portadora de diferentes endófitos e somente poucas espécies vegetais têm sido sistematicamente estudadas quanto à biologia de sua comunidade microbiana endofítica associada. Conseqüentemente, a oportunidade de encontrar microrganismos endofíticos novos e benéficos entre a diversidade de plantas em diferentes ecossistemas e biomas é considerável. (STROBEL; DAISY, 2003).

Muitas razões podem ser citadas para que os estudos sobre microrganismos endofíticos sejam encorajados e continuados: a capacidade de promover o crescimento vegetal, aumento da produção e captação de nutrientes (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000; SINGH et al., 2000); por colonizarem nichos similares aos de muitos fitopatógenos, estes microrganismos têm sido considerados adequados para o controle biológico (VAN-HEESWIJCK; MCDONALD, 1992; BACON et al., 2001); estão envolvidos no controle de patógenos e insetos (KRISHNAMURTHY; GNANAMANICKAM, 1997; ARNOLD et al., 2003; AZEVEDO et al., 2000); a investigação da biodiversidade de endófitos tem levado à descoberta de compostos bioativos novos com aplicação na medicina, indústria e agricultura (STROBEL; DAISY, 2003; GUNATILAKA, 2006); podem funcionar como vetores para expressão de genes nas plantas hospedeiras (HAAPALAINEN et al., 1998); podem potencializar a capacidade de biorremediação de compostos tóxicos por plantas (DOTY, 2008); podem conferir proteção contra diferentes estresses abióticos (MALINOWSKI; BELESKY, 2000); permitem a ocupação de ambientes extremos pelas plantas (REDMAN et al., 2002; MÁRQUEZ et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2008); muito do que se conhece sobre as funções destes microrganismos ainda são restritas às suas conseqüências finais e faltam informações sobre os aspectos ecológicos, fisiológicos e genéticos sobre a interação endófito-planta (HERD et al., 1997; TANAKA et al., 2006; RYAN et al., 2008); não é conhecido se as comunidades microbianas interagem dentro das plantas, e se os efeitos observados são decorrências da combinação de efeitos de diferentes microrganismos endofíticos (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). O repertório dos efeitos e das funções dos endófitos nas plantas ainda não é totalmente compreendido, e muitos dos processos da simbiose somente ocorrem durante a associação dos organismos participantes e não podem ser facilmente separados para análise ou manipulação. Alguns pesquisadores têm relatado que um dos desafios dessa área de pesquisa é manusear as comunidades microbianas para favorecer a colonização das plantas por microrganismos

benéficos. Para tanto, um maior conhecimento sobre a ecologia dos endófitos e suas interações ao nível molecular se faz necessário (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Grande parte dos estudos sobre microrganismos endofíticos foi realizada principalmente a partir de plantas de clima temperado, no entanto, revisões recentes têm sido publicadas sobre a ocorrência e distribuição de endófitos em plantas cultivadas e nativas de clima tropical e subtropical (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; MENDES; AZEVEDO, 2007; PEREIRA et al., 2007). Plantas de clima tropical são consideradas grandes reservatórios de microrganismos endofíticos e a conservação e prospecção de uso da diversidade microbiana endofítica é diretamente dependente da conservação dos ecossistemas tropicais (STROBEL; DAISY, 2003; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

Um gargalo existente na área de pesquisa sobre microrganismos endofíticos é relacionado aos métodos de estudo destes organismos. Pode-se dizer que a quantidade e qualidade de microrganismos recuperados são altamente dependentes das condições utilizadas para seu isolamento. Estudos sobre a diversidade de microrganismos endofíticos são baseados no isolamento a partir dos tecidos internos após desinfecção da superfície da planta com hipoclorito de sódio ou agentes similares, seguida da transferência de fragmentos vegetais ou de diluições dos tecidos macerados em soluções tampão para meios de cultura apropriados (ARAÚJO et al., 2002b). Dependendo do objetivo do trabalho e da espécie vegetal, variações do procedimento básico podem ser utilizadas (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; ARAÚJO et al., 2002b). A facilidade com que podem ser isolados faz com que os endófitos sejam considerados uma fonte promissora de novos produtos biotecnológicos.

Adicionalmente, diferentes abordagens moleculares e bioquímicas têm sido desenvolvidas e aplicadas para estudos de ecologia microbiana, na tentativa de compreender a estrutura e função de comunidades microbianas complexas (por exemplo, abordagem metagenômica; DGGE; perfil de isótopos estáveis e incorporação metabólica de nucleotídeos análogos como bromodeoxiuridina – BrdU) (THERON; CLOETE, 2000; HEAD; BAILEY; 2003; VANDENKOORNHUYSE et al., 2007), sendo também úteis para o estudo de microrganismos endofíticos. Estas novas tecnologias têm permitido a realização de análises comparativas entre comunidades cultivadas e não cultivadas de endófitos e têm levado à confirmação de que os microrganismos cultivados representam apenas uma parcela da biodiversidade de microrganismos endofíticos (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; ARAÚJO et al., 2002a; REITER;

SESSITSCH, 2006; VANDENKOORNHUYSE et al., 2007). Este fato amplia ainda mais a possibilidade de utilização destes microrganismos como fonte de novos compostos com aplicação nas áreas médica, agrícola e industrial. A crescente demanda por fontes renováveis de energia coloca os endófitos em posição de destaque, fazendo seu estudo extremamente importante para seleção de linhagens promissoras que promovam a produção sustentável de biomassa e bioenergia a partir de diferentes plantas cultivadas (RYAN et al., 2008), tanto pela capacidade de promoção de crescimento, quanto pela descoberta de novas atividades enzimáticas.

À medida que novos métodos são desenvolvidos para acessar a diversidade microbiana, associados ao seqüenciamento de genomas de um número maior de espécies endofíticas, e à utilização de diferentes ferramentas de genômica funcional, pode-se caminhar em direção ao melhor conhecimento das relações entre endófitos e plantas. Por exemplo, podem-se desvendar os mecanismos moleculares da interação simbiótica que são responsáveis pelos benefícios ao fitness vegetal. Pouco se conhece sobre o impacto e as funções das comunidades microbianas endofíticas na ecofisiologia das plantas, e tais abordagens podem ser úteis para acessar a estrutura de comunidades endofíticas (ARNOLD; LUTZONI, 2007), a importância destas associações para manutenção e funcionamento de diferentes ecossistemas (RODRIGUEZ et al., 2009) e quais endófitos são ativos em determinado órgão vegetal (VANDENKOORNHUYSE et al., 2007).

É importante salientar que uma planta é capaz de abrigar diferentes comunidades microbianas (fungos, bactérias, arqueias, vírus e mesmo algas). Ainda assim, muitas vezes o estudo das interações microrganismo-planta é acessado por meio de abordagens reducionistas. A época atual é propícia para utilização de uma abordagem sistêmica no estudo da simbiose microrganismo-planta, por meio da análise de simbiontes dentro de plantas hospedeiras individuais, em múltiplos hospedeiros dentro de um hábitat específico, e entre diferentes ecossistemas (RODRIGUEZ et al., 2009).

1.1.2 Interações entre fungos endofíticos e plantas

1.1.2.1 Aspectos gerais

Os tecidos internos das plantas servem como nichos para diferentes grupos ecológicos de fungos endofíticos tais como mutualistas, comensais e patógenos latentes. De modo geral, dois grupos de fungos endofíticos têm sido reconhecidos, refletindo diferenças nas relações evolutivas, taxonomia, planta hospedeira e funções ecológicas: endófitos clavicipitáceos e

endófitos não clavicipitáceos (SCHULZ; BOYLE, 2005; SIEBER, 2007). Os primeiros compreendem espécies pertencentes à família Clavicipitaceae, que formam simbioses quase que exclusivamente com gramíneas (Poaceae) de clima temperado. Estes fungos colonizam as plantas hospedeiras de modo sistêmico e várias espécies são transmitidas verticalmente pelas sementes para a próxima geração (SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004).

Os fungos endofíticos clavicipitáceos são reconhecidos por potencializar o *fitness* da planta hospedeira pela produção de substâncias alcalóides que inibem a herbivoria por insetos, pela produção de metabólitos que estimulam o crescimento vegetal, e por conferirem tolerância à escassez hídrica (ARECHAVALETA et al., 1989; BUSH; WILKINSON; SCHARDL, 1997; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004). No entanto, os benefícios conferidos por estes fungos parecem depender da espécie de planta, do genótipo da planta e das condições ambientais (FAETH; SULLIVAN, 2003; CHEPLICK, 2006). Esta associação é a mais estudada das interações entre fungos endofíticos e plantas, tanto do ponto de vista dos efeitos da presença do fungo endofítico no interior da planta hospedeira, quanto em relação aos aspectos ecológicos e evolutivos da interação.

Os fungos endofíticos não clavicipitáceos abrangem espécies filogeneticamente diversas com diferentes estratégias de vida. A elevada diversidade com que ocorrem dentro das plantas faz com que suas funções sejam difíceis de discernir e na maioria dos casos elas não têm sido exploradas, embora interações benéficas sejam freqüentemente relatadas. Além disso, poucos trabalhos abordam o significado ecológico e evolutivo das relações envolvendo endófitos não clavicipitáceos. De acordo com Rodriguez et al. (2009), mais de 1000 artigos científicos têm sido publicados sobre estes fungos desde 1970, mas poucos investigaram a relação simbiótica in planta. A pesquisa sobre endófitos não clavicipitáceos tem sido voltada para a descrição de espécies em tecidos assintomáticos, produção de metabólitos bioativos, potencial de utilização para o biocontrole e análises de sistemática baseada em filogenia (SCHULZ; BOYLE, 2005; SAIKKONEN, 2007; HIGGINS et al., 2007; SMITH et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2009).

Nos casos onde a interação in planta foi avaliada, os efeitos destes fungos parecem ser bem mais complexos e variáveis. Estes fungos podem promover o crescimento e o aumento da produção (VARMA et al., 1999; MUCCIARELLI et al., 2003; ERNST; MENDGEN; WIRSEL, 2003; WALLER et al., 2005; SERFLING et al., 2007), podem produzir fitormônios (NASSAR; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2005; SIRRENBERG et al., 2007), podem conferir

tolerância a altas temperaturas e estresse salino (BALTRUSCHAT et al., 2008; MÁRQUEZ et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2008), proteção contra fitopatógenos e indução de resistência (ARNOLD et al., 2003; NARISAWA et al., 2002; WALLER et al., 2005; CAMPANILE; RUSCELLI; LUISI, 2007; MACIA'-VICENTE et al., 2008; WALLER et al., 2008; HERRE et al., 2007), captação de nutrientes minerais como nitrato e fósforo (SINGH et al., 2000) e garantem a sobrevivência e o estabelecimento das plantas em ambientes extremos (REDMAN et al., 2002). Além disso, são considerados uma rica fonte de compostos de interesse biotecnológico como enzimas (LUMYONG et al., 2002; TORRES et al., 2003) e metabólitos secundários novos com atividades biológicas diversas (PELÁEZ et al., 1998; TAN; ZOU, 2001; SCHULZ et al., 2002; STROBEL; DAISY, 2003; SMITH et al., 2008).

Por apresentarem histórias de vida e efeitos tão diversos, Rodriguez et al. (2009) propuseram a separação dos fungos endofíticos em diferentes grupos funcionais, na tentativa de clarificar e facilitar o acesso às questões chave na pesquisa sobre cada grupo funcional. Estes autores basearam-se em alguns critérios tais como padrão de colonização, mecanismo de transmissão entre as gerações do hospedeiro, níveis de biodiversidade *in planta*, e função ecológica, para agrupar os fungos endofíticos em quatro grupos funcionais (Tabela 1.1). O grupo 1 representa os fungos endofíticos clavicipitáceos discutidos anteriormente, os quais são restritos a algumas espécies de plantas da família Poaceae. Estes fungos colonizam a parte aérea das plantas e sua transmissão é preferencialmente vertical, o nível de diversidade *in planta* é baixo, e conferem benefícios ao fitness vegetal independentemente do habitat (Tabela 1.1).

Os grupos 2, 3 e 4 representam os endófitos não clavicipitáceos (Tabela 1.1). Uma característica dos fungos endofíticos do grupo 2 que os distingue dos outros grupos é a capacidade de conferir benefícios ao *fitness* vegetal adaptados ao habitat. Esse fenômeno pode ser exemplificado pela associação entre *Curvularia protuberata* e plantas de solos termais (*Dichanthelium lanuginosum*). Em uma série de experimentos em laboratório e no ambiente, foi verificado que nessa associação, nem a planta nem o fungo conseguem sobreviver separadamente em solos com temperatura elevada, mas quando associados, ambos toleram altas temperaturas (REDMAN et al., 2002; MÁRQUEZ et al., 2007). No entanto, quando esta associação é submetida a outro tipo de estresse, por exemplo, estresse salino ou patógenos, o fungo não protege a planta dos efeitos danosos do estresse (RODRIGUEZ et al., 2008). O mesmo foi verificado para plantas que crescem em solos com alta salinidade (*Leymus mollis*). Estas plantas

Tabela 1.1 – Critérios de simbiose utilizados para caracterizar grupos de fungos endofíticos

Critério	Endófitos clavicipitáceos	Endófitos não clavicipitáceos		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Amplitude de hospedeiros	Restrita	Ampla	Ampla	Ampla
Tecidos colonizados	Parte aérea e rizoma	Parte aérea, raiz, e rizoma	Parte aérea	Raiz
Colonização <i>in planta</i>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Biodiversidade <i>in planta</i>	Baixa	Baixa	Alta	Desconhecida
Transmissão	Vertical e horizontal	Vertical e horizontal	Horizontal	Horizontal
Benefícios ao <i>fitness</i> (*)	Não adaptados ao habitat (NHA)	Não adaptados ao habitat (NHA) e adaptados ao habitat (HA)	Não adaptados ao habitat (NHA)	Não adaptados ao habitat (NHA)

(*) Benefícios ao *fitness* da planta não adaptados ao habitat (NHA), tais como tolerância a escassez hídrica e promoção do crescimento são comuns entre os endófitos independentemente do habitat de origem. Benefícios ao *fitness* da planta adaptados ao habitat (HA) resultam de pressões seletivas específicas do habitat, tais como pH, temperatura e salinidade. Fonte: Rodriguez et al. (2009).

são associadas com *Fusarium culmorum*, o qual confere tolerância à elevada salinidade, e as partes também não sobrevivem quando separadas. Do mesmo modo, *F. culmorum* protege as plantas contra estresse salino, mas não contra estresse térmico e patógenos. Já isolados destes fungos que foram obtidos a partir de plantas cultivadas em ambientes agriculturáveis, conferem proteção contra patógenos, mas não contra estresse térmico ou salino. Os autores verificaram então que os fungos endofíticos conferem tolerância a estresse que é específica ao habitat (RODRIGUEZ et al., 2008). Um aspecto importante deste fenômeno é que ele pode ser reproduzido em monocotiledôneas e dicotiledôneas cultivadas (RODRIGUEZ et al., 2008).

Os fungos do grupo 3 são altamente diversos e encontrados nas partes aéreas das plantas. Sua transmissão é exclusivamente horizontal e muito pouco é conhecido sobre suas funções nas plantas hospedeiras. Este grupo inclui os endófitos hiperdiversos encontrados nas partes aéreas de espécies de plantas de clima tropical e também em florestas boreais, do Ártico a Antártica (FISHER et al., 1995; LODGE et al., 1996; FRÖHLICH; HYDE, 1999; MURALI et al., 2007; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Existem evidências que apontam que estes fungos são distintos de patógenos latentes e da comunidade fúngica epifítica (GANLEY; BRUNSFELD; NEWCOMBE, 2004; SANTAMARÍA; BAYMAN, 2005; RODRIGUEZ et al., 2009; mas veja as posições de Promputtha et al. (2007) e Selosse et al. (2008)). O estudo deste grupo é voltado para a busca de metabólitos ativos, embora existam alguns relatos sobre seu potencial para o biocontrole de

patógenos em plantas de clima tropical (ARNOLD et al., 2003). Dos grupos propostos por Rodriguez et al. (2009), este é o que mais carece de estudos, tanto do ponto de vista dos possíveis benefícios ao fitness vegetal, quanto dos aspectos ecológicos e evolutivos da interação. Os fungos do grupo 4 são conhecidos como endófitos DSE (*dark septate endophytes*) e colonizam exclusivamente as raízes das plantas. Sua função também é pouco compreendida, mas tem sido relacionada à capacidade de promoção de crescimento, proteção contra patógenos e à distribuição de plantas em ambientes extremos (MANDYAM; JUMPPONEN, 2005). Conforme salientado por Rodriguez et al. (2009), à medida que novas associações vão sendo analisadas, a composição dos grupos apresentados pode ser revisada e ampliada.

Uma associação que merece destaque envolve a capacidade de fungos entomopatogênicos colonizarem endofiticamente plantas cultivadas. Fungos entomopatogênicos podem ser naturalmente encontrados como endofíticos em várias espécies de plantas, como café, milho, banana, cacau, maçã (VEGA, 2008; CAMATTI-SARTORI et al., 2005) e muitas espécies entomopatogênicas que foram inoculadas artificialmente em algumas plantas também demonstraram capacidade de estabelecimento de uma interação endofítica (QUESADA-MORAGA et al., 2006; AKELLO et al., 2007; GÓMEZ-VIDAL et al., 2006). Outros exemplos de espécies vegetais colonizadas por entomopatógenos podem ser encontrados nos trabalhos de Vega (2008) e Vega et al. (2008). O entendimento da ecologia de fungos entomopatogênicos e de sua função como endófitos podem levar a um novo paradigma sobre como utilizar estes microrganismos em programas de controle biológico (VEGA, 2008).

Embora a busca por associações benéficas seja o motor dos estudos sobre fungos endofíticos, também há relatos de algumas espécies de fungos isoladas como endofíticas de plantas assintomáticas, que quando reintroduzidas na planta hospedeira não induziram sintomas de doença, mas levaram a uma diminuição do crescimento vegetal (SCHULZ et al., 1998, 1999), da eficiência fotossintética (PINTO et al., 2000) e desregulação do balanço hídrico (ARNOLD; ENGELBRECHT, 2007) e mesmo de espécies patogênicas que se comportam como mutualistas ou comensais em plantas não hospedeiras (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001).

De acordo com Saikkonen (2007) a posição de um fungo endofítico em um ecossistema, e como ele responde aos recursos disponíveis e aos competidores, isto é, o seu nicho, pode ser modificado porque o fungo continuamente influencia e é influenciado por fatores bióticos e abióticos, dentro dos limites de seu genótipo e de sua plasticidade fenotípica. Consequentemente,

o período de latência do fungo pode variar no tempo ecológico. Por exemplo, um fungo pode mudar seu estilo de vida de patogênico para mutualista ou comensal após a modificação em um único gene, ou devido a mudanças na composição de microrganismos na superfície foliar, ou a mudanças na planta hospedeira como consequência da disponibilidade alterada de nutrientes nos solos, ferimentos ou senescência (SAIKKONEN, 2007; FAETH; HAMMON, 1997; FREEMAN; RODRIGUEZ, 1993).

Tais estudos demonstram a complexidade e plasticidade da relação entre fungos endofíticos e plantas, e que não cabe a visão simplista de patógenos causando doenças, mutualistas conferindo benefícios e saprófitas reciclando nutrientes. Com base neste tipo de estudo, esta relação tem sido designada como um balanço de antagonismos que é finamente regulado e dependente das respostas de defesa da planta e da demanda por nutrientes do endófito, bem como das condições ambientais que permeiam a interação (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006). Embora muito tenha sido descrito, a maior parte do que se conhece sobre as relações endófito-planta ainda é restrita às suas consequências finais. Menos ainda é conhecido sobre a interação entre fungos endofíticos e outros microrganismos naturalmente associados à filosfera e rizosfera das plantas (ARAÚJO et al., 2001, BANDARA et al., 2006; WICKLOW; POLING, 2009). Os estudos sobre microrganismos endofíticos ainda analisam as comunidades microbianas separadamente, considerando apenas bactérias ou apenas fungos. Pouco é conhecido sobre a dinâmica das interações entre estas comunidades dentro das plantas, e quais fatores levam ao desequilíbrio dessas interações. Esta área de pesquisa, juntamente com as relações destes fungos com outros organismos que se relacionam com as plantas, em interações multitróficas, pode ser considerada um campo aberto para investigação, especialmente em ecossistemas tropicais ou em ambientes extremos.

1.1.2.2 Interações entre fungos endofíticos e plantas ao nível celular e molecular

O início do estabelecimento de uma interação endofítica pode ocorrer pela entrada do fungo por meio da formação de estruturas como apressórios na superfície das folhas, como em *Discula umbrinella* (VIRET et al., 1993) ou na superfície das raízes, como em *Piriformospora indica* (VARMA et al., 1999). Muitos fungos endofíticos também podem entrar na planta hospedeira através de aberturas naturais como estômatos, como *Beauveria bassiana*, a qual germina e cresce de forma aleatória sobre folhas de milho, entrando via estômatos ou por entre as

células da epiderme através da cutícula, pela ação de enzimas líticas (WAGNER; LEWIS, 2000). As espécies da família Clavicipitaceae, principalmente as do gênero *Neotyphodium*, colonizam a planta hospedeira de forma sistêmica e são transmitidas via sementes (SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004). Como visto anteriormente, os estudos de interações entre fungos endofíticos e plantas têm abordado principalmente a simbiose mutualista entre fungos da família Clavicipitaceae e gramíneas de clima temperado da família Poaceae. Os endófitos pertencentes ao gênero *Epichloë* (anamorfo = *Neotyphodium*), habitam os espaços intercelulares das folhas e sua presença pode conferir resistência ao estresse hídrico, promoção de crescimento e proteção contra herbívoros, por meio da síntese de metabólitos e toxinas alcalóides. A planta por sua vez fornece aos fungos nutrientes a partir do apoplasto e um modo de disseminação por meio das sementes (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Muito pouco é conhecido sobre os fatores importantes na colonização do hospedeiro e na troca de nutrientes entre a planta e o fungo. Estudos sobre os aspectos fisiológicos da interação endófito-planta identificaram algumas enzimas expressas por *Neotyphodium* durante a simbiose com gramíneas da família Poaceae, por exemplo, proteinase subtilisina (REDDY et al., 1996), β -1,6-glicanase (MOY et al., 2002) e quitinases (LI et al., 2004). Estas enzimas estão relacionadas à obtenção de nutrientes a partir do apoplasto e são consideradas componentes importantes da interação mutualística por estarem localizadas na interface das duas espécies.

Mesmo com o avanço da biologia molecular, o estudo das interações entre fungos endofíticos e plantas ao nível celular e molecular é relativamente recente. A dificuldade em estudar essa associação ao nível molecular é que muitos processos da simbiose somente ocorrem quando as duas partes estão interagindo. Nesse aspecto, sistemas de transformação genética foram desenvolvidos para fungos endofíticos clavicipitáceos e permitiram a transferência de genes repórteres como β -D-glicoronidase, *gusA*, de *Escherichia coli*. O sistema GUS mostrou-se útil para estudos da biologia da interação endofítica, permitindo o acompanhamento da dinâmica de crescimento das hifas nos espaços intercelulares das folhas e a análise da distribuição da atividade metabólica e expressão gênica in planta (MURRAY; LATCH; SCOTT, 1992; HERD et al., 1997; TAN et al., 2001). Mais recentemente, a utilização do sistema repórter GFP juntamente com análises de microscopia eletrônica desvendaram um novo mecanismo de crescimento do fungo endofítico *Neotyphodium* por meio de extensão intercalar das hifas, desafiando o conceito centenário de que os fungos só crescem por extensão apical das hifas (CHRISTENSEN et al.,

2008). Como revisado por Azevedo et al. (2000), o desenvolvimento de sistemas de transferência de genes para fungos endofíticos abriu a possibilidade de manipulação genética do endófito e reintrodução nas plantas hospedeiras visando o controle de insetos e doenças.

A análise genética desta interação tem sido voltada principalmente para identificação de genes envolvidos na síntese de toxinas alcalóides e metabolismo secundário (WANG et al., 1999; YOUNG et al., 1999; TUDZYNSKI et al., 1999; PANACCIONE et al., 2001; FLEETWOOD et al., 2007) e no padrão de expressão e regulação desses genes *in planta* (TANAKA et al., 2005; ZHANG et al., 2006). Por exemplo, Spiering et al. (2002) identificaram, por meio da técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH), genes associados à biossíntese de alcalóides (lolinas) *in vitro* pelo endófito *N. uncinatum*. Estes autores utilizaram condições de crescimento permissivas e não permissivas para produção de alcalóides e obtiveram bibliotecas de cDNA enriquecidas com transcritos envolvidos na síntese destes compostos, os quais têm efeito inseticida e estão envolvidos na proteção das plantas contra o ataque por herbívoros. Posteriormente, estes autores utilizaram genes previamente identificados por SSH para localizar dois clusters gênicos envolvidos na biossíntese de lolinas, e confirmaram o envolvimento de alguns genes na produção destes compostos por meio de RNA de interferência (SPIERING et al., 2005).

Johnson et al. (2003) também utilizaram SSH para identificar genes diferencialmente expressos pela gramínea *Lolium arundinaceum* durante a interação com *N. coenophialum*. Estes autores identificaram genes exclusivamente expressos pela planta durante a associação com o fungo endofítico, muitos deles com funções relacionadas à defesa e tolerância a estresse. Encontraram também genes expressos pela planta exclusivamente na interação e sem função conhecida, e também verificaram que o endófito é capaz de sobrepor as defesas da planta conferidas por algumas PR proteínas específicas.

Felitti et al. (2006) desenvolveram um estudo em larga escala dos perfis de expressão gênica por meio de microarranjos de DNA, em diferentes condições de crescimento saprofítico e em associação com diferentes plantas hospedeiras para os fungos endofíticos *N. coenophialum*, *N. lolli* e *E. festucae*, resultando na criação de uma base de dados de genomas de fungos endofíticos (<http://hornbill.cspp.latrobe.edu.au/>). Esta estratégia representa a possibilidade de identificação de genes específicos da interação mutualista entre estes fungos e diferentes espécies de gramíneas da família Poaceae. Mais recentemente, Young et al. (2009) analisaram diferentes isolados do fungo *N. lolli* na tentativa de entender a variação quanto à produção de compostos

tóxicos para insetos e mamíferos herbívoros. Os autores utilizaram primers para genes específicos envolvidos na produção de alcalóides diterpenos, juntamente com análise bioquímica, para identificar e selecionar isolados produtores de compostos tóxicos para insetos herbívoros, mas não para mamíferos, facilitando a seleção de linhagens a serem utilizadas em programas de melhoramento adaptativo de forrageiras.

Em relação aos endófitos não clavicipitáceos, os primeiros estudos de manipulação genética de fungos endofíticos de plantas de clima tropical foram realizados no Brasil (AZEVEDO et al., 2000) e resultaram no desenvolvimento de sistemas de transferência de genes e em procedimentos de reintrodução dos endófitos em plantas de clima tropical (PAMPHILE et al., 1997; PEREIRA et al., 1999; GLIENKE-BLANCO, 1999). Desde então, poucos estudos moleculares da interação endofítica envolvendo fungos não clavicipitáceos têm sido realizados. Por exemplo, Chacón et al. (2007) verificaram que *Trichoderma harzianum* é capaz de colonizar endofiticamente as raízes de plantas de tomate por meio de análises de microscopia de uma linhagem marcada com o gene da proteína verde fluorescente (GFP). Para investigar quais processos são ativados no fungo e que permitem a colonização endofítica, os autores avaliaram o transcriptoma de *T. harzianum* durante os primeiros estágios da colonização das raízes e encontraram um aumento na expressão de genes envolvidos em reações redox, metabolismo de lipídios, detoxificação e transporte de açúcares e aminoácidos, de modo similar ao que ocorre nas interações entre fungos patogênicos e fungos micorrízicos com plantas.

Uma associação que tem sido bastante estudada do ponto de vista genético e fisiológico envolve o endófito *Piriformospora indica*. Este fungo coloniza especificamente raízes e foi descoberto em associação com plantas do deserto de Thar, na Índia, em 1997. Desde então, tem sido considerado de grande importância agrônômica, pois estimula o crescimento vegetal e a produção de várias espécies de plantas, monocotiledôneas e dicotiledôneas, onde a associação tem sido estudada (SINGH et al., 2000; WALLER et al., 2005). Além disso, a colonização das raízes das plantas pelo fungo dispara respostas de defesa na parte aérea das plantas (indução de resistência sistêmica), contra diferentes fitopatógenos, e também protege as plantas contra diferentes tipos de estresse abiótico, como estresse salino (WALLER et al., 2005; SCHÄFER; KHATABI; KOGEL, 2007). A capacidade de interação mutualista de *P. indica* com *Arabidopsis thaliana* tem facilitado estudos genéticos dessa associação, devido ao enorme conhecimento genético e fisiológico existente para esta planta modelo. Nesse aspecto, a capacidade de

promover o crescimento das plantas tem sido relacionada à captação de nutrientes, principalmente nitrato, e também à produção de auxinas *in vivo* (SIRRENBORG et al., 2007). Estudos ao nível celular mostraram que a colonização das raízes é extensa e que o fungo redireciona as células radiculares para aceitar seu crescimento invasivo e dependente do fenômeno de morte celular programada, sem provocar os sistemas de defesa das raízes (SCHÄFER; KHATABI; KOGEL, 2007). Isto mostrou que esta relação é bastante diferente de outras associações mutualistas, como as associações micorrízicas, sendo considerada uma nova relação mutualista entre plantas e fungos. Maiores detalhes desta interação simbiótica podem ser encontrados na revisão de Schäfer, Khatabi e Kogel (2007).

Um dos poucos exemplos de análise molecular da interação entre endófitos não clavicipitáceos e plantas de clima tropical foi descrito por Mendes (2008). Este trabalho verificou que fungos do gênero *Fusarium* são frequentemente isolados como endofíticos dos tecidos de cana-de-açúcar. Uma vez que *F. verticillioides* é capaz de causar doença em cana-de-açúcar, o autor investigou possíveis diferenças genéticas entre isolados patogênicos e endofíticos desse fungo por meio da análise de expressão de duas endo-poligalacturonases (pgI e pgIII). Foi demonstrado que os isolados podem ser diferenciados pelo nível de transcrição do gene da endo-poligalacturonase pgIII, e que esta diferença pode desempenhar importante papel no comportamento endofítico ou patogênico de *F. verticillioides* na interação com cana-de-açúcar.

Como visto, os estudos genéticos da interação entre fungos endofíticos e plantas são voltados principalmente para associações que ocorrem em regiões de clima temperado e que muitos aspectos da interação durante a simbiose são praticamente desconhecidos e pobremente estudados. Entretanto, também foi demonstrado como abordagens moleculares podem contribuir não somente para a descoberta de novas associações e fenômenos biológicos envolvendo fungos endofíticos, mas também para aplicação prática como seleção de linhagens com maior capacidade de colonização endofítica para fins de controle biológico ou aumento da performance de plantas cultivadas. Embora seqüências genômicas de fungos endofíticos ainda não estejam disponíveis, muitas ferramentas moleculares utilizadas para análise da interação patógeno-planta podem ser utilizadas para análise de interações mutualistas, e juntamente com os avanços no conhecimento das vias moleculares ativadas nas plantas durante a interação com microrganismos, podem levar a uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares acionados durante a simbiose.

1.1.3 Algumas ferramentas que têm facilitado o estudo da interação fungo-planta

1.1.3.1 Transformação de fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O potencial da genética molecular tem sido extensivamente explorado no estudo e manipulação de microrganismos, levando ao desenvolvimento de novas tecnologias que podem ser aplicadas tanto para eucariotos quanto para procariotos. Nesse aspecto, a transformação genética tem exercido uma função significativa não somente para o entendimento da biologia dos seres vivos, mas também para a potencialização e melhoramento de características particulares de determinados organismos. Entre os microrganismos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem contribuído enormemente para o aperfeiçoamento de ferramentas genéticas, incluindo a transferência de material genético. Desde os primeiros relatos de transformação de *S. cerevisiae* (HINNEN; HICKS; FINK, 1978) e do fungo filamentoso *Neurospora crassa* (MISHRA; TATUM, 1973) vários sistemas de transformação têm sido desenvolvidos para muitos outros fungos.

Nesse contexto, a disponibilidade de diferentes métodos de transferência de genes, associada as diferentes estratégias de mutagênese insercional aleatória ou sítio-específica, de silenciamento gênico pós-transcricional e de genômica funcional tem propiciado um grande avanço no conhecimento da função gênica e da interação fungo-planta (LORENZ, 2002; WELD et al., 2006; NAKAYASHIKI; NGUYEN, 2008). Maiores detalhes das metodologias existentes para transformação de fungos como protoplasto-PEG, acetato de lítio, eletroporação e biolística, bem como dos sistemas de seleção e dos mecanismos de transformação podem ser encontrados nas revisões de Fincham (1989), Kahmann e Basse (1999), Mullins e Kang (2001) e Ruiz-Diez (2002).

A metodologia de transformação que se baseia na utilização da bactéria fitopatogênica *A. tumefaciens* é muito utilizada para manipulação genética de plantas (TZFIRA; CITOVSKY, 2006) e também tem sido adaptada para transferência de genes para células humanas (KUNIK et al., 2001). Em fungos, o método foi primeiramente adaptado por Bundock et al. (1995) para transformação de *S. cerevisiae*, e posteriormente aplicado aos fungos filamentosos (GROOT et al., 1998). Desde então, esta metodologia tem sido empregada com sucesso para transformação de dezenas de fungos (Tabela 1.2) incluindo membros dos filos Ascomycota, Basidiomycota, Zigomicota, Glomeromicota e também para oomicetos (MICHIELSE et al., 2005a; LACROIX et al., 2006).

Tabela 1.2 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*^(a), incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

(continua)

Espécie ^(a)	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter ^(b)	Referência
Basidomicetos			
<i>Agaricus bisporus</i>	Cogumelo comestível	<i>hph, gfp</i>	Groot et al. (1998); Chen et al. (2000); Mikosch et al. (2001); Burns et al. (2006); Eastwood et al. (2008)
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Cogumelo medicinal	x	Chen et al. (2009)
<i>Cryptococcus gattii</i>	Patógeno humano	<i>NAT</i>	McClelland et al. (2005)
<i>C. neoformans</i>	Patógeno humano	<i>NAT</i>	Walton et al. (2005); McClelland et al. (2005); Yeh et al. (2009)
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Ectomicorriza	<i>hph, Hc Sdh, gfp</i>	Combier et al. (2003); Müller et al. (2006); Ngari et al. (2009)
<i>Hypholoma sublateritium</i>	Produtor de antitumoral	<i>hph, gfp</i>	Godio e Martín (2009)
<i>Laccaria bicolor</i>	Ectomicorriza	<i>hph</i>	Kemppainen et al. (2005); Kemppainen et al. (2009)
<i>Laccaria laccata</i>	Ectomicorriza	<i>hph</i>	Coelho et al. (2008)
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Grassi, Rincones e Pereira (2007)
<i>Omphalotus olearius</i>	x	<i>hph</i>	Michielse et al. (2005)
<i>Paxillus involutus</i>	Ectomicorriza	<i>Sh BLE</i>	Pardo et al. (2002)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	x	<i>hph</i>	Michielse et al. (2005)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ligninolítico; degrada poluentes	<i>hph, gfp</i>	Li e Zhang (2005); Sharma et al. (2006)
<i>Pisolithus microcarpus</i>	Ectomicorriza	<i>Sh BLE</i>	Pardo et al. (2005)
<i>P. tinctorius</i>	Ectomicorriza	<i>hph, gfp</i>	Rodríguez-Tovar et al. (2005)
<i>Pseudozyma antarctica</i>	Potencial farmacêutico	<i>hph, gfp</i>	Marchand et al. (2007)
<i>Suillus bovinus</i>	Ectomicorriza	<i>hph, Sh BLE, gfp</i>	Hanif et al. (2002); Pardo et al. (2002)
<i>S. grevillei</i>	Ectomicorriza	<i>hph, DsRed</i>	Murata et al. (2006)
<i>Tricholoma matsutake</i>	Ectomicorriza	<i>hph</i>	Murata et al. (2006)
<i>Volvariella volvacea</i>	Cogumelo comestível	<i>afp</i>	Wang et al. (2008)
Ascomicetos			
<i>Acremonium implicatum</i>	Endofítico	<i>hph, gfp</i>	Abello, Kelemu e García (2008)
<i>Ascochyta rabiei</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Mogensen et al. (2006); White e Chen (2006; 2007)
<i>Aspergillus awamori</i>	Importância industrial	<i>hph, BLE, Aa pyrG,</i>	Groot et al. (1998); Gouka et al. (1999)
<i>A. carbonarius</i>	Micotoxigênico	<i>hph</i>	Lunardi et al. (2006); Morioka et al. (2006)
<i>A. fumigatus</i>	Patógeno humano	<i>hph</i>	Sugui et al. (2005)
<i>A. giganteus</i>	Produtor de antimicrobianos	<i>hph</i>	Meyer et al. (2003)
<i>A. niger</i>	Importância industrial	<i>hph</i>	Groot et al. (1998)
<i>A. westerdijkiae</i>	Micotoxigênico	<i>hph</i>	Mata et al. (2007)

Tabela 1.2 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*^(a), incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

(continuação)

Espécie ^(a)	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter ^(b)	Referência
<i>Beauveria bassiana</i>	Entomopatógeno	<i>hph, bar</i>	Reis et al. (2004); Leclerque et al. (2004); Xu et al. (2009)
<i>Botrytis cinerea</i>	Fitopatógeno	<i>hph, gfp</i>	Rolland et al. (2003); Shen et al. (2008)
<i>Cadophora finlandia</i>	Endofítico	<i>hph, gfp</i>	Gorfer et al. (2007)
<i>Calonectria morgani</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Malonek e Meinhardt (2001)
<i>Candida ssp.</i>	Patógeno humano	x	Oliveira et al. (2007)
<i>Candida albicans</i>	Patógeno humano	<i>hph</i>	Michielse et al. (2005)
<i>Candida glabrata</i>	Patógeno humano	<i>hph</i>	Michielse et al. (2005)
<i>Candida glycerinogenes</i>	Importância industrial	<i>BLE</i>	Zhiming et al. (2008)
<i>Candida tropicalis</i>	Patógeno humano	<i>hph</i>	Michielse et al. (2005)
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Importância industrial	<i>Sh BLE</i>	Wei, Zhu e Zhu (2005)
<i>Ceratocystis resinifera</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Loppnau, Tanguay, Breuil (2004)
<i>Chaetomium globosum</i>	x	<i>hph</i>	Xing-Xi e Qiang (2005)
<i>Claviceps purpurea</i>	Fitopatógeno	<i>BLE</i>	Michielse et al. (2005)
<i>Clonostachys rosea</i>	Agente de controle biológico	<i>hph</i>	Mamarabadi, Jensen e Lübeck (2008)
<i>Coccidioides immitis</i>	Patógeno humano	<i>hph</i>	Abuodeh et al. (2000)
<i>C. posadasii</i>	Patógeno humano	<i>hph, gfp</i>	Kellner et al. (2005); Li et al. (2007)
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Fitopatógeno	<i>hph, gfp</i>	Talhinhas et al. (2008); Maruthachalam et al. (2008)
<i>C. destructivum</i>	Fitopatógeno	<i>hph, gfp</i>	O'Connell et al. (2004)
<i>C. falcatum</i>	Fitopatógeno	<i>hph, gfp</i>	Maruthachalam et al. (2008)
<i>C. gloeosporioides</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Groot et al. (1998)
<i>C. graminicola</i>	Fitopatógeno	<i>hph, gfp</i>	Flowers e Vaillancourt (2005)
<i>C. higginsianum</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Huser et al. (2009)
<i>C. lagenarium</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Tsuji et al. (2003)
<i>C. trifolii</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Takahara et al. (2004)
<i>Coniothyrium minitans</i>	Agente de controle biológico	<i>hph</i>	Rogers et al. (2004); Li et al. (2005); Gong et al. (2007)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Park e Kim (2004)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Endofítico; controle biológico	<i>hph, gfp</i>	Fávaro e Araújo (2007)
<i>Fusarium circinatum</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Covert et al. (2001)
<i>F. culmorum</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Michielse et al. (2005a)
<i>F. equiseti</i>	Endofítico	<i>gfp</i>	Maciá-Vicente et al. (2009)

Tabela 1.2 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*^(a), incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

(continuação)

Espécie ^(a)	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter ^(b)	Referência
<i>F. graminearum</i>	x		Frandsen et al. (2006); Lysøe et al. (2006)
<i>F. oxysporum</i>	Fitopatógeno; controle biológico	<i>hph, BLE, gfp</i>	Khang et al. (2005); van der Does et al. (2008); Mullins et al. (2001); Pantelides et al. (2009)
<i>F. solani</i>	x	<i>bar</i>	Liu e Bao (2009)
<i>F. venenatum</i>	Importância industrial	<i>hph</i>	Groot et al. (1998)
<i>Glarea lozoyensis</i>	Importância industrial	<i>hph</i>	Zhang et al. (2003)
<i>Gliocladium roseum</i>	Agente de controle biológico	<i>hph</i>	Utermark e Karlovsky (2007)
<i>Helminthosporium turcicum</i>	Fitopatógeno	<i>hph, gfp</i>	Degefu e Hanif (2003)
<i>Heterobasidion annosum</i>	Fitopatógeno	<i>hph, gfp</i>	Samils et al. (2006)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Patógeno humano	<i>hph, Hc ura5</i>	Sullivan et al. (2002); Marion et al. (2006); Hilty et al. (2008)
<i>Khuyveromyces lactis</i>	Importância industrial	<i>Sc ura3</i>	Bundock et al. (1999); Kooistra et al. (2004)
<i>Leptosphaeria maculans</i>	Fitopatógeno	<i>hph, DsRed, gfp</i>	Gardiner e Howlett (2004); Gardiner et al. (2005); Eckert et al. (2005); Elliott e Howlett (2006); Blaise et al. (2007); Remy et al. (2008); Fox et al. (2008)
<i>L. biglobosa</i>	Fitopatógeno	<i>hph, DsRed, gfp</i>	Eckert et al. (2005)
<i>Magnaporthe grisea</i>	Fitopatógeno	<i>hph, nptII</i>	Rho et al. (2001); Khang et al. (2005); Tucker et al. (2007); Li et al. (2007); Hof et al. (2007); Gupta et al. (2007; 2008)
<i>M. oryzae</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Meng et al. (2007); Jeon et al. (2007); Betts et al. (2007); Chi et al. (2009)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Entomopatógeno	<i>bar, benA3, gfp</i>	Fang et al. (2006); Staats et al. (2007); Moon et al. (2008); Fang et al. (2009)
<i>M. anisopliae var. acridum</i>	Entomopatógeno	<i>bml</i>	Duarte et al. (2007)
<i>Monascus purpureus</i>	Importância industrial	<i>hph, gfp</i>	Campoy et al. (2003)
<i>M. ruber</i>	Importância industrial	<i>hph, gfp</i>	Yang e Lee (2008)
<i>Monilinia fructicola</i>	Fitopatógeno	<i>hph, nptII</i>	Dai et al. (2003); Lee e Bostock (2006)
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Zwiers e De Waard (2001)
<i>M. fijiensis</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Michielse et al. (2005)
<i>Neurospora crassa</i>	Organismo modelo	<i>hph</i>	Groot et al. (1998)
<i>Oidiodendron maius</i>	Endomicorriza ericóide	<i>hph, gfp</i>	Martino et al. (2007)
<i>Ophiostoma floccosum</i>	x	x	Tanguay et al. (2006)
<i>O. piceae</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Tanguay, Tangen, Breuil (2007)
<i>O. piliferum</i>	Fitopatógeno	<i>hph</i>	Hoffman e Breuil (2004)
<i>Oculimacula yallundae</i>	Fitopatógeno	<i>hph, DsRed, gfp</i>	Eckert et al. (2005)

Tabela 1.2 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*^(a), incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

(continuação)

Espécie ^(a)	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter ^(b)	Referência
<i>O. acufiformis</i>	Fitopatígeno	<i>hph, DsRed, gfp</i>	Eckert et al. (2005)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Entomopatígeno	<i>hph</i>	Lima et al. (2006)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Patógeno humano	<i>hph, gfp</i>	Leal et al. (2004); Almeida et al. (2007)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Importância industrial	<i>BLE</i>	Sun, Kong e Xu (2002)
<i>P. digitatum</i>	Fitopatígeno	<i>hph</i>	Wang e Li (2008)
<i>P. marneffeii</i>	Patógeno humano	x	Zhang et al. (2008)
<i>Phialocephala fortinii</i>	Endofítico	<i>hph, gfp</i>	Gorfer et al. (2007)
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Endofítico	<i>gfp</i>	Maciá-Vicente et al. (2009)
<i>Rosellinia necatrix</i>	Fitopatígeno	<i>hph</i>	Aimi et al. (2005)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Organismo modelo	<i>trp1, Sc ura3, aphI</i>	Bundock et al. (1995); Piers et al. (1996); Rao et al. (2008)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Fitopatígeno	<i>hph</i>	Weld, Eady e Ridgway (2006)
<i>Trichoderma asperellum</i>	Agente de controle biológico	<i>hph, Sh BLE</i>	Cardoza et al. (2006)
<i>T. atroviride</i>	Agente de controle biológico	<i>hph, Sh BLE</i>	Zeilinger (2004); Cardoza et al. (2006)
<i>T. hamatum</i>	Agente de controle biológico	<i>hph</i>	Carpenter et al. (2008)
<i>T. harzianum</i>	Agente de controle biológico	<i>hph, Sh BLE</i>	Gao et al. (2004); Gao et al. (2005); Cardoza et al. (2006); Yang et al. (2007); Huang et al. (2008)
<i>T. longibrachiatum</i>	Agente de controle biológico	<i>hph, Sh BLE</i>	Cardoza et al. (2006)
<i>T. reesei</i>	Importância industrial	<i>hph</i>	Groot et al. (1998); Zhong et al. (2007); Zhong et al. (2009)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Patógeno humano	<i>hph</i>	Yamada et al. (2008)
<i>Tuber borchii</i>	Ectomicorriza	<i>hph, gfp</i>	Grimaldi et al. (2005)
<i>Venturia inaequalis</i>	Fitopatígeno	<i>hph, NAT</i>	Fitzgerald et al. (2003); Fitzgerald et al. (2004)
<i>Verticillium dahliae</i>	Fitopatígeno	<i>hph, DsRed</i>	Rauyaree et al. (2005); Klimes et al. (2006); Pantelides et al. (2009)
<i>V. fungicola</i>	Fitopatígeno	<i>hph, gfp</i>	Amey et al. (2002); Amey et al. (2003)
Zigomicetos			
<i>Backusella lamprospora</i>	Importância industrial	<i>hph, gfp</i>	Nyilasi et al. (2008)
<i>Blakeslea trispora</i>	Importância industrial	<i>hph</i>	Michielse et al. (2005)
<i>Mucor circinelloides</i>	Importância industrial	<i>hph</i>	Nyilasi (2004); Nyilasi et al. (2005)
<i>Mucor miehei</i>	Importância industrial	<i>aphI</i>	Monfort et al. (2003)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Importância industrial	<i>Rn pyr4</i>	Michielse et al. (2004)

Tabela 1.2 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*^(a), incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

(conclusão)

Espécie ^(a)	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter ^(b)	Referência
Glomeromicetos			
<i>Glomus intraradices</i>	Micorriza arbuscular	<i>DsRed</i>	Helber e Requena (2007)
Oomicetos			
<i>Phytophthora infestans</i>	Fitopatígeno	<i>nptII</i>	Vijn e Govers (2003)
<i>P. palmivora</i>	Fitopatígeno	<i>nptII, hph</i>	Vijn e Govers (2003)
<i>Pythium ultimum</i> var. <i>sporangiferum</i>	Fitopatígeno	<i>nptII</i>	Vijn e Govers (2003)

(a) Esta lista de espécies é baseada nas revisões anteriores de Michielse et al. (2005) e Lacroix et al. (2006) e no trabalho de Soltani, van Heusden e Hooykaas (2008), com modificações e atualizações. **(b)** *hph*: gene de resistência a higromicina de *Escherichia coli*. *NAT*: gene de resistência a nourseothricin de *Streptomyces noursei*. *bar*: gene da fosfinotricina acetiltransferase de *Streptomyces hygrosopicus*, confere resistência ao glufosinato de amônio; *Sh BLE*: gene de resistência a pleomicina de *Streptoalloteicus hindustanus*. *BLE*: gene de resistência pleomicina, confere resistência a zeocina; *benA3*: gene de resistência ao benomyl. *Aa pyrG*: gene da orotidina-5'-fosfato decarboxilase de *Aspergillus awamori*, permite a seleção de prototróficos para uracila. *nptII*: gene da neomicina fosfotransferase, confere resistência a geneticina. *afp*: gene de proteína anticongelante, permite a seleção de transformantes resistentes a baixa temperatura. *Hc Sdh (R)*: gene de resistência a carboxina de *Hebeloma cylindrosporium*. *Hc ura5*: gene da orotato fosforibosiltransferase de *Histoplasma capsulatum*, permite a seleção de prototróficos para uracila. *Sc ura3*: gene *ura3* de *Saccharomyces cerevisiae*, permite a seleção de prototróficos para uracila. *aphI*: transposon Tn903 de *E. coli*, confere resistência ao análogo da canamicina (geneticina). *Rn pyr4*: gene da orotidina-5'-fosfato decarboxilase de *R. niveus*, permite a seleção de prototróficos para uridina. *trp1*: gene da N-C5' fosforibosil-antranilato isomerase de *S. cerevisiae*, permite a seleção de prototróficos para o triptofano. *DsRed*: gene da proteína vermelha fluorescente do coral *Discosoma striata*. *gfp*: gene da proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*.

Tal metodologia baseia-se na transferência pela bactéria *A. tumefaciens* de uma região denominada T-DNA (DNA de transferência) contendo genes a serem expressos nas células fúngicas. Em plantas, a infecção natural por *A. tumefaciens* leva ao desenvolvimento de tumores (galhas) por meio da transferência por esta bactéria de parte de seu plasmídeo Ti (T-DNA), para a célula hospedeira. Genes deste T-DNA levam à expressão de substâncias relacionadas ao desenvolvimento do tumor. O plasmídeo Ti contém os genes *vir* que codificam proteínas envolvidas na transferência do T-DNA para a célula hospedeira. A região T-DNA é flanqueada por duas seqüências curtas (aproximadamente 25 pares de bases) denominadas LB e RB (borda esquerda e borda direita). O processo de transferência do T-DNA em células vegetais envolve uma série de etapas tais como quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento do T-DNA, transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA ao núcleo e integração no genoma da célula hospedeira (TZFIRA et al., 2004; CITOVSKEY et al., 2007).

O plasmídeo Ti das linhagens de *A. tumefaciens* utilizadas para transformação *in vitro* não apresenta a região T-DNA e as bordas LB e RB, e assim a bactéria perde a capacidade de transferir material genético para a célula hospedeira. Neste caso, o plasmídeo Ti passa a ser denominado de “plasmídeo desarmado” ou “helper”, pois apesar de não ter a região T-DNA, este vetor contém os genes *vir* responsáveis pela maquinaria de transferência. Por outro lado, a região do T-DNA é modificada pela remoção dos oncogenes que são substituídos por genes de interesse e inserida em um segundo vetor, denominado vetor binário (vetores binários são derivados de plasmídios capazes de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*, e se mantêm de forma independente do plasmídeo Ti, ou seja, funcionam *in trans*). Este vetor binário é re-introduzido em uma linhagem de *A. tumefaciens* contendo o “plasmídeo desarmado” a qual readquire a capacidade de transformar células hospedeiras (LACORTE; ROMANO, 1998).

A literatura mostra que a agro-transformação apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais de transformação de fungos, como por exemplo, a possibilidade de utilização de células intactas como conídios, micélio vegetativo ou corpos de frutificação como material inicial, eliminando a necessidade de geração de protoplastos (MICHIELSE et al., 2005a). Além disso, soma-se a simplicidade durante a execução da metodologia e a não necessidade de equipamentos como o acelerador de microprojéteis ou o eletroporador. A alta eficiência de transformação e o fato de que qualquer segmento de DNA inserido entre as bordas esquerda e direita (LB e RB) do T-DNA pode ser integrado no genoma do hospedeiro bem como a

ocorrência de integração em cópias simples em sítios aleatórios no genoma, estão entre os motivos responsáveis pela crescente preferência por esta metodologia (LIMA, 2005).

Estas características têm estimulado o emprego desta metodologia como ferramenta para obtenção de mutantes e isolamento de genes de interesse via mutagênese insercional aleatória (RHO et al., 2001; COMBIER et al., 2003; ROGERS et al., 2004; LECLERQUE et al., 2004; WALTON et al., 2005; WHITE; CHEN, 2007; ZHONG et al., 2007; TALHINHAS et al., 2008; HUSER et al., 2009). Também, se a região T-DNA apresentar seqüências homólogas ao genoma do hospedeiro, a integração pode ocorrer por recombinação homóloga, evidenciando a utilidade da transformação por *Agrobacterium* para mutagênese direcionada ou em experimentos de nocaute gênico (GOUKA et al., 1999; ZWIERS et al., 2001; ZHANG et al., 2003; ZEILINGER, 2004; SUGUI et al., 2005; KHANG et al., 2005; GONG et al., 2007; GODIO; MARTÍN, 2009; MOON et al., 2008).

Devido à natureza heterocariótica ou multinucleada do micélio de muitos fungos, à investigação de genes essenciais ou à baixa taxa de recombinação homóloga em alguns grupos, muitas vezes abordagens de nocaute gênico não são adequadas, e nesses casos a agro-transformação tem sido útil para estudos da função gênica por meio de silenciamento gênico mediado por RNA de interferência (FITZGERALD et al., 2004; EASTWOOD et al., 2008; KEMPPAINEN et al., 2009). Nesse aspecto, a transformação mediada por *A. tumefaciens* tem sido considerada uma ferramenta importante no contexto da genômica funcional de fungos, à medida que mais seqüências genômicas tornam-se disponíveis e surge a necessidade de avaliação sistemática da função dos genes preditos nos projetos de seqüenciamento (JEON et al., 2007).

Com base na literatura, grande parte dos trabalhos utiliza esta ferramenta para o estudo e descoberta de genes envolvidos no processo de patogenicidade em plantas ou animais. No entanto, recentemente a versatilidade deste procedimento tem sido aproveitada também para transferência de genes para fungos mutualistas como fungos micorrízicos, muitos dos quais eram considerados recalcitrantes a outros métodos de transformação (HANIF et al., 2002; GRIMALDI et al., 2005; RODRÍGUEZ-TOVAR, et al., 2005; MÜLLER et al., 2006; MARTINO et al., 2007; HELBER; REQUENA, 2007) e também para alguns fungos endofíticos como *A. implicatum* (ABELLO; KELEMU; GARCÍA, 2008) e *P. fortinii* (GORFER et al., 2007).

Nesse contexto, a eficiência e flexibilidade deste método podem ser aproveitadas para transformação de espécies endofíticas, que não tenham um sistema de transformação bem

definido ou sejam recalcitrantes a outros métodos de transferência de genes. A utilização desta metodologia pode contribuir para o estudo da biologia da interação entre fungos endofíticos e a planta hospedeira através, por exemplo, da transferência de genes repórteres e monitoramento da expressão durante os estágios de colonização do tecido hospedeiro, bem como para estudos de mutagênese insercional e isolamento de mutantes alterados no processo de interação endofítica. Além disso, como relatado anteriormente nessa revisão, muitos fungos endofíticos são capazes de produzir metabólitos novos com atividades biológicas diversas, e esta metodologia pode ser de grande utilidade para descoberta de novos genes envolvidos na produção destes compostos.

1.1.3.2 Utilização de proteínas autofluorescentes no estudo da interação fungo-planta

Desde a clonagem do gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) de *Aequorea victoria* por Prasher (1992) e posteriormente a demonstração por Chalfie et al. (1994) que ela poderia ser utilizada como um marcador para expressão gênica em células de eucariotos, vários trabalhos demonstraram sua expressão em bactérias, em leveduras, células de mamíferos e de *Drosophila*, em *Dictyostelium*, em plantas e também em fungos filamentosos (LORANG et al., 2001). O sucesso da proteína verde fluorescente como sistema repórter pode ser atribuído ao fato de que sua fluorescência depende somente de ultravioleta e oxigênio, diferentemente de outros sistemas repórteres (β -glicoronidase, β -galacturonidase, cloranfenicol acetil transferase ou luciferase), os quais requerem cofatores ou substratos para atividade. Esta característica permite a observação in vivo da expressão da GFP em células individuais, populações de células, ou em organismos inteiros interagindo com simbioses ou com o ambiente em tempo real (LORANG et al., 2001; LARRAINZAR; O'GARA; MORRISSEY, 2005).

Quando acoplada à microscopia confocal ou às técnicas quantitativas de análise de imagens, a tecnologia GFP pode ser utilizada para isolar células de uma população de células, quantificar a expressão de células dentro de um organismo, acessar a dispersão e biomassa de organismos em ambientes complexos como em biofilmes, em fermentadores, sobre a superfície e no interior das plantas ou em solos (LORANG et al., 2001). Também pode ser utilizada para estudos de localização celular e transporte de proteínas específicas, funcionamento de promotores, e como biosensores de mudanças físico-químicas ambientais e detecção de poluentes (MARCH; RAO; BENTLEY, 2003).

A partir do primeiro relato de expressão da GFP no fungo filamentosso *Ustilago maydis* (SPELLIG et al., 1996), vários vetores de expressão contendo diferentes genes promotores e formas variantes da GFP que permitem melhor expressão em fungos têm sido desenvolvidos (PÖGGELER et al., 2003). Assim, dezenas de espécies de fungos de interesse agrícola, industrial e médico têm sido transformadas com o gene *gfp*, incluindo membros dos filos Ascomycota, Basidiomycota, Zigomicota e também oomicetos.

O sistema GFP bem como outras versões de proteínas autofluorescentes, como a proteína vermelha fluorescente (DsRed) do coral *Discosoma striata*, têm sido utilizados para estudar estilos de vida patogênicos e não patogênicos e para o monitoramento dos padrões de infecção e colonização de fungos fitopatogênicos tais como *Colletotrichum*, *Magnaporthe*, *Cochliobolus*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Mycosphaerella*, *Verticillium*, *Leptosphaeria* ssp, *Rosellinia* e diferentes espécies de *Fusarium* em seus respectivos hospedeiros (MAOR et al., 1998; LORANG et al., 2001; BALINT-KURTI et al., 2001; LAGOPODI et al., 2002; HOROWITZ et al., 2002; OREN et al., 2003; SKADSENA; HOHN, 2004; MIKKELSEN et al., 2003; ECKERT et al., 2005; PLIEGO et al., 2009). A expressão de proteínas autofluorescentes também tem sido útil para monitorar a expressão de genes específicos envolvidos no processo patogênico durante a infecção e o movimento de microtúbulos durante a formação de apressórios, contribuindo para o estudo das interações patógeno-hospedeiro (DUMAS et al., 1999; ISSHIKI et al., 2003; TAKANO et al., 2001; DUYVESTEIJN et al., 2005; WEBER et al., 2006; COLLEMARE et al., 2008).

Esta tecnologia também tem sido aplicada com sucesso em estudos ecológicos de espécies de fungos empregadas no biocontrole de insetos (INGLIS et al., 2000; HU; ST LEGER, 2002; CAO et al., 2007) e de fitopatógenos (BAE; KNUDSEN, 2000; LÜBECK et al., 2002; SARROCCO et al., 2006; ZHANG et al., 2008; PANTELIDES et al., 2009). Tais investigações permitem não somente o monitoramento da dinâmica de populações e da persistência desses organismos no ambiente, mas também a análise de interações na interface micoparasita-patógeno-planta (LU et al., 2004; NEVEU; LABBÉ; BÉLANGER, 2007).

Com o desenvolvimento da metodologia de transformação de fungos mediada por *A. tumefaciens* (ATMT), vetores binários contendo o gene *gfp* têm recentemente sido desenvolvidos e transferidos para diversas espécies de fungos como os fitopatógenos *V. inaequalis*, *C. destructivum*, *B. cinerea*, *Leptosphaeria* ssp e *C. graminicola* (FITZGERALD et

al., 2003; O'CONNELL et al., 2004; ROLLAND et al., 2003; ECKERT et al., 2005; FLOWERS; VAILLANCOURT, 2005), o entomopatógeno *M. anisopliae* (FANG et al., 2006), o fungo produtor de pigmentos *M. purpureus* (CAMPOY et al., 2003), os basidomicetos *A. bisporus* e *C. cinereus* (CHEN et al., 2000; BURNSA et al., 2005) bem como para os fungos micorrízicos *S. bovinus*, *T. borchii*, *H. cylindrosporum* e *G. intraradices* (HANIF et al., 2002; GRIMALDI et al., 2005; MÜLLER et al., 2006; HELBER; REQUENA, 2008). Como pode ser verificado, a expressão de GFP representa uma ferramenta importante para o estudo das interações patógeno-hospedeiro e tem contribuído para o entendimento de vários aspectos da patogênese de fungos. Nesse contexto, esta tecnologia também pode ser utilizada para acessar a interação entre fungos endofíticos e plantas hospedeiras.

1.1.4 O fungo *Epicoccum nigrum*

Epicoccum nigrum Link, também denominado *Epicoccum purpurascens* Ehrenb. ex. Schlecht., é um fungo cosmopolita encontrado em solos e em vários habitats naturais onde atua como decompositor primário de tecidos vegetais. Geralmente é considerado saprofítico primário, embora tenha sido descrito como patógeno fraco em certas plantas (BRUTON et al., 1993). Na natureza, geralmente é encontrado sobre tecidos senescentes, ou material vegetal em decomposição, mas também pode ser recuperado do filoplano de plantas jovens (SADAKA; PONGE, 2003; STOHR; DIGHTON, 2004). No entanto, seus conídios são frequentemente encontrados no ar e constituem a causa de muitas desordens respiratórias e alergias em humanos (NOBLE et al., 1997; BISHT et al., 2004).

Epicoccum nigrum L. é um fungo ascomiceto mitospórico (Leptosphaeriaceae) que produz conídios muriformes de pigmentação escura a partir de conidióforos desenvolvidos na superfície de um esporodóquio. O esporodóquio, por sua vez, consiste numa massa de hifas pseudoparenquimatosas, também denominada estroma, e que possui forma semelhante à almofada (MIMS; RICHARDSON, 2005). Até 1959, aproximadamente 70 espécies eram descritas para o gênero *Epicoccum*, mas após estudos sobre a estrutura e o desenvolvimento de conídios, foi observado que estas espécies poderiam ser unificadas em uma única espécie variável (SCHOL-SCHWARZ, 1959).

Em estudos de populações naturais de *E. purpurascens*, Kilpatrick e Chilvers (1981) encontraram elevada variabilidade morfológica e fisiológica, como coloração da colônia,

produção de enzimas extracelulares e capacidade de antagonismo, entre 2000 isolados provenientes de amostras de ar e de plantas de uma mesma região geográfica, corroborando os achados anteriores de Schol-Schwarz (1959). Em um dos poucos estudos moleculares sobre a diversidade desta espécie (ARENAL et al., 1999, 2002), várias técnicas moleculares baseadas em PCR foram utilizadas para acessar a variabilidade genética de um mesmo grupo de linhagens de *E. nigrum* provenientes de diferentes substratos e ecossistemas, em comparação com diferentes técnicas fenotípicas, verificando também extensa variabilidade nesta espécie e ausência de correlação entre região geográfica e similaridade genética.

E. nigrum também é conhecido por produzir metabólitos secundários de interesse biotecnológico, incluindo pigmentos carotenóides (GRIBANOVSKI-SASSU; FOPPEN, 1967; BAHRIM; ŞOPTICĂ, 2004; MAPARI; MEYER; THRANE, 2008) e flavonóides (ŞOPTICĂ; BAHRIM, 2005) com atividade antioxidante (BLEOJU; GONZÁLEZ SANJOSÉ, 2007). Um composto fluorescente denominado epicocconona foi isolado de *E. nigrum* (BELL; KARUSO, 2003) e constitui um novo fluoróforo para coloração de membranas de células vivas (CHOI; VEAL; KARUSO, 2006), sendo comercialmente disponível como LavaCell™ (ActiveMotif). Além disso, este composto também é utilizado para detecção de proteínas em géis de eletroforese uni e bidimensional (MACKINTOSH et al., 2003; COGHLAN; MACKINTOSH; KARUSO, 2005), sendo comercializado como Deep Purple™ Total Protein Stain (GE Healthcare).

Metabólitos secundários com atividade antimicrobiana também foram isolados a partir de *Epicoccum*, entre eles os antibacterianos epicorazinas A-B (BAUTE et al., 1978), epicoccinas A-D (ZHANG et al., 2007), epicoccarinas A-B e epipiridona (KEMAMI WANGUN; HERTWECK, 2007), bem como os antifúngicos flavipina (BAMFORD; NORRIS; WARD, 1961) e epirodina (IKAWA et al., 1978). Além disso, *Epicoccum* também produz antioxidantes como isobenzofuranona (ABDEL-LATEFF et al., 2003), o composto orevactaeno, o qual inibe a replicação de HIV-1 (SHU et al., 1997), um novo inibidor de protease do tipo quimotripsina, epicoccalona (KEMAMI WANGUN; ISHIDA; HERTWECK, 2008), os compostos epicoccamidas B-D, com atividade antiproliferativa contra linhagens celulares de leucemia humana (WANGUN; DAHSE; HERTWECK, 2007), e outros metabólitos secundários como epicoccamida (WRIGHT; OSTERHAGE; KÖNIG, 2003). *E. nigrum* também é capaz de produzir sideróforos (FREDERICK et al., 1981) e exopolissacarídeos de interesse industrial, como beta-

glicanas (SCHMID et al., 2006). Além disso, apresenta capacidade biocatalítica de xenobióticos (WEBSTER et al., 1998) e de biotransformação de acetofenonas (ANDRADE et al., 2004).

A atividade antagonista de *E. nigrum* frente a fungos fitopatogênicos e sua utilização no biocontrole é bastante conhecida. Este fungo tem sido extensivamente avaliado no controle de *Monilinia laxa* em pêssego e nectarina (LARENA et al., 2005; LARENA; DE CAL; MELGAREJO, 2007; MARI et al., 2007; DE CAL et al., 2009), de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão e girassol (ZHOU; REELEDER, 1989; ZHOU; REELEDER; SPARACE, 1991; HUANG et al., 2000; PIECKENSTAIN et al., 2001), *Phyitium* em algodão (HASHEM; ALI, 2004) e *Diplodia corticola* em *Quercus* sp. (CAMPANILE; RUSCELLI; LUISI, 2007).

Além disso, *E. nigrum* é comumente encontrado como endófito em várias espécies de plantas de clima tropical (PEREIRA et al., 1999; CAMATTI-SARTORI et al., 2005) e isolados endofíticos desta espécie também tem demonstrado atividade antimicrobiana (PELÁEZ et al., 1998) bem como capacidade de biocontrole (CAMPANILE; RUSCELLI; LUISI, 2007). Em estudo recente sobre a comunidade de fungos endofíticos de *Saccharum officinarum* (ROMÃO et al., 2006; STUART, 2006), foi observado que *E. nigrum* está presente também em tecidos de cana-de-açúcar.

Como pode ser observado *E. nigrum* apresenta grande potencial biotecnológico, tanto para a produção de metabólitos como para controle biológico, mas pouco é conhecido sobre a natureza da interação endofítica desta espécie com hospedeiros de clima tropical, bem como sua função durante a interação com a planta hospedeira. Por ser uma das espécies endofíticas comumente encontrada em associação com *S. officinarum*, o entendimento da estrutura populacional de *E. nigrum*, da interação e dos mecanismos moleculares envolvidos durante a simbiose com a planta, podem contribuir para o melhor entendimento sobre a plasticidade da interação entre fungos endofíticos e plantas de regiões tropicais.

Referências

ABDEL-LATEFF, A.; FISCH, K. M.; WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G. M. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 831-834, 2003.

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

ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A.; DAS, A.; GALGIANI, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 181, p. 2106–2110, 2000.

AIMI, T.; TAGUCHI, H.; TANAKA, Y.; KITAMOTO, Y.; MORINAGA, T. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated genetic transformation of the white root rot ascomycete *Rosellinia necatrix*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, p. 27–31, 2005.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C. S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 96, p. 34–42, 2007.

ALMEIDA, A. J.; CARMONA, J. A.; CUNHA, C.; CARVALHO, A.; RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E.; HOOYKAAS, P. J.; LEÃO, C.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1387–1398, 2007.

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

AMEY, R. C.; MILLS, P. R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. Investigating the role of a *Verticillium fungicola* beta-1,6-glucanase during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 39, p. 264–275, 2003.

ANDRADE, L. H.; KEPPLER, A. F.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 31, p. 129-135, 2004.

ARECHA VALETA, M.; BACON, C. W.; HOVELAND, C. S.; RADCLIFE, D. E. Effects of tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, p. 83-90, 1989.

ARNOLD, A. E.; ENGELBRECHT, B. M. J. Fungal endophytes double minimum leaf conductance in seedlings of a tropical tree. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 23, p. 369–372, 2007.

ARNOLD, E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, Brooklyn, v. 88, p. 541–549, 2007.

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

ARAÚJO, W.L.; LIMA A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVAL, P.T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002b. 86p.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR. W.; AGUILAR-VILDOSO C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002a.

ARENAL, F.; PLATAS, G.; MARTÍN, J.; ASENSIO, F.J.; SALAZAR, O.; COLLADO, J.; VICENTE, F.; BASILIO, A.; RUIBAL, C.; ROYO, I.; DE PEDRO, N.; PELÁEZ, F. Comparison of genotypic and phenotypic techniques for assessing the variability of the fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 36–45, 2002.

ARENAL, F.; PLATAS, G.; MARTÍN, J.; SALAZAR, O.; PELÁEZ, F. Evaluation of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for assessing the genetic variability of isolates of the fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 898–906, 1999.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, 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.

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

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 109, suppl., p. 325-332, 2001.

BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with β -glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 810-815, 2000.

BAHRIM, G.; ŞOPTICĂ, F. Correlative effect of solid media on yellow pigmentogenesis at an *Epicoccum* sp. Strain. **Roumanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 9, p. 757-762, 2004.

- BALINT-KURTI, P. J.; MAY, G. D.; CHURCHILL, A.C.L. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, p. 9-15, 2001.
- BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J.; HARRACH, B. D.; NIEMCZYK, E.; BARNA, B.; GULLNER, G.; JANECKO, A.; KOGEL, K. H.; SCHÄFER, P.; SCHWARCZINGER, I. et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. **New Phytologist**, London, v. 180, p. 501–510, 2008.
- BAMFORD, P. C.; NORRIS, G. L. F.; WARD, G. Flavipin production by *Epicoccum* spp. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 44, p. 354–356, 1961.
- BANDARA, W. M.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 31, p. 645-650, 2006.
- BAUTE, M. A.; DEFFIEUX, G.; BAUTE, R.; NEVEU, A. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. I. Fermentation, isolation and antibacterial properties. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 31, p. 1099–1105, 1978.
- BELL, P. J. L.; KARUSO, P. Epicoccone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 125, p. 9304-9305, 2003.
- BETTS, M. F.; TUCKER, S. L.; GALADIMA, N.; MENG, Y.; PATEL, G.; LI, L.; DONOFRIO, N.; FLOYD, A.; NOLIN, S.; BROWN, D.; MANDEL, M. A.; MITCHELL, T. K.; XU, J. R.; DEAN, R. A.; FARMAN, M. L.; ORBACH, M. J. Development of a high throughput transformation system for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1035–1049, 2007.
- BISHT, V.; ARORA, N.; BHANU, P.S.; PASHA, S.; GAUR, S. N.; SRIDHARA, S. Epi p 1, an allergenic glycoprotein of *Epicoccum purpurascens* is a serine protease. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 42, p. 205-211, 2004.
- BLAISE, F.; REMY, E.; MEYER, M.; ZHOU, L.; NARCY, J. P.; ROUX, J.; BALESSENT, M. H.; ROUXEL, T. A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 123-138, 2007.
- BLEOJU, M. M.; GONZÁLEZ SANJOSÉ, M. L. Study about the stability and some technological properties of the pigments synthesized by *Epicoccum nigrum*. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, Galati, v. 1, p. 37–44, 2007.
- BRUTON, B. D.; REDLIN, S. C.; COLLINS, J. K.; SAMS, C. E. Post harvest decay of cantaloupe caused by *Epicoccum nigrum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 1060–1062, 1993.

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

BUNDOCK, P.; MRÓCZEK, K.; WINKLER, A. A.; STEENSMA, H. Y.; HOOYKAAS, P. J. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 261, p. 115-121, 1999.

BURNS, C.; LEACH, K. M.; ELLIOTT, T. J.; CHALLEN, M. P.; FOSTER, G. D.; BAILEY, A. Evaluation of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus* using a range of promoters linked to hygromycin resistance. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 32, p. 129-138, 2006.

BURNSA, C.; GREGORYB, K.E.; KIRBYA, M.; CHEUNGA, M.K.; RIQUELME, M.; ELLIOTT, T.J.; CHALLENB, M.P.; BAILEYA, A.; FOSTERA, G.D. Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 191-199, 2005.

BUSH, L. P.; WILKINSON, H. W.; SCHARDL, C. L. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 1-7, 1997.

CAMATTI - SARTORI, V.; AZEVEDO, J. L.; SANHUEZA, R. M. V.; RIBEIRO, R. T. S.; ECHEVERRIGARAY, S. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 397-402, 2005.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 237-246, 2007.

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

CAO, Y.; PENG, G.; HE, Z.; WANG, Z.; YIN, Y.; XIA, Y. Transformation of *Metarhizium anisopliae* with benomyl resistance and green fluorescent protein genes provides a tag for genetically engineered strains. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 29, p. 907-911, 2007.

CARDOZA, R. E.; VIZCAINO, J. Á.; HERMOSA, M R.; MONTE, E.; GUTIERREZ, S. A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, p. 383-395, 2006.

CARPENTER, M. A.; RIDGWAY, H. F.; STRINGER, A. M.; HAY, A. J.; STEWART, A. Characterisation of a *Trichoderma hamatum* monooxygenase gene involved in antagonistic activity against fungal plant pathogens. **Current Genetics**, Berlin, v. 53, p. 193-205, 2008.

- CHACÓN, M. R.; RODRÍGUEZ-GALÁN, O.; BENÍTEZ, T.; SOUSA, S.; REY, M.; LLOBELL, A.; DELGADO-JARANA, J. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 10, p. 19–27, 2007.
- CHALFIE, M., Y. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD, AND D. C. PRASHER. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v. 263, p. 802–805, 1994.
- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.
- CHEN, E. C.; SU, Y. H.; KANAGARAJAN, S.; AGRAWAL, D. C.; TSAY, H. S. Development of an activation tagging system for the basidiomycetous medicinal fungus *Antrodia cinnamomea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 290-297, 2009.
- CHEN, X.; STONE, M.; SCHLAGNHAUFER, C.; ROMAINE, P. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4510–4513, 2000.
- CHEPLICK, G. P. Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from eurasia and north africa under extreme resource limitation. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 202–210, 2006.
- CHI, M.-H.; PARK, S.-Y.; KIM, S.; LEE, Y.-H. A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host. **PLoS Pathog**, San Francisco, v. 5, 2009. Disponível em: <http://www.plospathogens.org/article/info:doi/10.1371/journal.ppat.1000401>. Acesso em 30 mar. 2009.
- CHOI, H. Y.; VEAL, D. A.; KARUSO, P. Epicocconone, a new cell-permeable long Stokes' shift fluorescent stain for live cell imaging and multiplexing. **Journal of Fluorescence**, New York, v. 16, p. 475-482, 2006.
- CHRISTENSEN, M. J.; BENNETT, R. J.; ANSARI, H. A.; KOGA, H.; JOHNSON, R. D.; BRYAN, G. T.; SIMPSON, W. R.; KOOLAARD, J. P.; NICKLESS, E. M.; VOISEY, C. R. *Epichloe* endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 84–93, 2008.
- CITOVSKY, V.; KOZLOVSKY, S, V.; LACROIX, B.; ZALTSMAN, A.; DAFNY-YELIN, M.; VYAS, S.; TOVKACH, A.; TZFIRA, T. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 9–20, 2007.
- COELHO, I. S.; ZUBIETA, M.P.; DELAZARI, F.T.; QUEIROZ, M. V.; ARAÚJO, E. F. Transformação do fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54, 2008, Salvador. **Resumos...SBG**, 2008. p. 64.

COGHLAN, D. R.; MACKINTOSH, J. A.; KARUSO, P. Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with epicocconone. **Organic Letters**, Washington, v. 7, p. 2401–2404, 2005.

COLLEMARE, J.; PIANFETTI, M.; HOULLE, A. E.; MORIN, D.; CAMBORDE, L.; GAGEY, M. J.; BARBISAN, C.; FUDAL, I.; LEBRUN, M. H.; BÖHNERT, H. U. *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 belongs to an infection-specific gene cluster involved in secondary metabolism. **New Phytologist**, London, v. 179, p. 196-208, 2008.

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

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

DAI, Q.; SUN, Z.; SCHNABEL, G. Development of spontaneous hygromycin B resistance in *Monilinia fructicola* and its impact on growth rate, morphology, susceptibility to demethylation inhibitor fungicides, and sporulation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 1354-1359, 2003.

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONO, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 273-284, 1999.

DEAKIN, W. J.; BROUGHTON, W. J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 312-320, 2009.

DE CAL, M. A.; LARENA, I.; LIÑÁN, M.; TORRES, R.; LAMARCA, N.; USALL, J.; DOMENICHINI, P.; BELLINI, A.; ERIBE, X. O.; MELGAREJO, P. Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, p. 592–605, 2009.

DEGEFU, Y.; HANIF, M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leafblight fungus. **Archives in Microbiology**, v. 180, p. 279–284, 2003.

DOTY, S. L. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. **New Phytologist**, London, v. 179, p. 318-333, 2008.

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

- DUMAS, B.; CENTIS, S.; SARRAZIN, N.; ESQUERRE-TUGAYE, M. T. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1769–1771, 1999.
- DUYVESTEIJN, R. G.; VAN WIJK, R.; BOER, Y.; REP, M.; CORNELISSEN, B. J.; HARING, M. A. Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 57, p. 1051-1063, 2005.
- EASTWOOD, D. C.; CHALLEN, M. P.; ZHANG, C.; JENKINS, H.; HENDERSON, J.; BURTON, K. S. Hairpin-mediated down-regulation of the urea cycle enzyme argininosuccinate lyase in *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 708–716, 2008.
- ECKERT, M.; MAGUIRE, K.; URBAN, M.; FOSTER, S.; FITT, B.; LUCAS, J.; HAMMOND-KOSACK, K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 253, p. 67–74, 2005.
- ELLIOTT, C. E.; HOWLETT, B. J. Overexpression of a 3-Ketoacyl-CoA thiolase in *Leptosphaeria maculans* causes reduced pathogenicity on *Brassica napus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 588–596, 2006.
- ERNST, M.; MENDGEN, K. W.; WIRSEL, G. R. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, p. 580-587, 2003.
- FAETH, S. H.; HAMMON, K. E. Fungal endophytes in oak trees. I. Long-term patterns of abundance and associations with leafminers. **Ecology**, Brooklyn, v. 78, p. 810–819, 1997.
- FAETH, S. H.; SULLIVAN, T. J. Mutualistic, asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. **American Naturalist**, Chicago, v. 161, p. 310–325, 2003.
- FANG, W.; PAVA-RIPOLL, M.; WANG, S.; ST. LEGER, R. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 277–285, 2009.
- FANG, W.; PEI, Y.; BIDOCHKA, M. J. Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 623–626, 2006.
- FÁVARO, L. C. L.; ARAÚJO, W. L. Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* do fungo endofítico de cana-de-açúcar *Epicoccum nigrum* com o gene da proteína verde fluorescente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5, 2007, Recife. **Resumos...** Recife:UFPE, 2007. p. 199.

FELITTI, S.; SHIELDS, K.; RAMSPERGER, M.; TIAN, P.; SAWBRIDGE, T.; WEBSTER, T.; LOGAN, E.; ERWIN, T.; FORSTER, J.; EDWARDS, D.; SPANGENBERG, G. Transcriptome analysis of *Neotyphodium* and *Epichloë* grass endophytes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, p. 465-475, 2006.

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

FISHER, P. J.; GRAF, F.; PETRINI, L. E.; SUTTON, B. C.; Wookey, P. A.. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic semidesert and from the Swiss alps. **Mycologia**, Lancaster, v. 87, p. 319–323, 1995.

FITZGERALD, A. M.; KAN, J.A.L.V.; PLUMMER, K.M. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 963–971, 2004.

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

FLEETWOOD, D. J.; SCOTT, B.; LANE, G. A.; TANAKA, A.; JOHNSON, R. D. A complex ergovaline gene cluster in epichloe endophytes of grasses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 2571-2579, 2007.

FLOWERS, J. L.; VAILLANCOURT, L. J. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 380–388, 2005.

FOX, E. M.; GARDINER, D. M.; KELLER, N. P.; HOWLETT, B. J. A Zn(II)₂Cys₆ DNA binding protein regulates the sirodesmin PL biosynthetic gene cluster in *Leptosphaeria maculans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 671–682, 2008.

FRANDBSEN, R. J.; NIELSEN, N. J.; MAOLANON, N.; SØRENSEN, J. C.; OLSSON, S.; NIELSEN, J.; GIESE, H. The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 61, p. 1069-1080, 2006.

FREDERICK, C. B.; SZANISZLO, P. J.; VICKEREY, P. E.; BENTLEY, M. D.; SHIVE, W. Production and isolation of siderophores from the soil fungus *Epicoccum purpurascens*. **Biochemistry**, Washington, v. 20, p. 2432–2436, 1981.

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

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

- GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 10107–10112, 2004.
- GAO, X.; YANG Q. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of CryA(b) gene to *Trichoderma harzianum*. **Chinese Science Bulletin**, Hong Kong, v. 49, p. 23, 2004. Abstract.
- GAO, X. X.; YANG, Q.; GUO, Z. K.; SONG, J. Z. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, Reading v. 32, p. 74–78, 2005.
- GARDINER, D. M.; HOWLETT, B. J. Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 249–255, 2004.
- GARDINER, D. M.; COZIENSEN, A. J.; WILSON, L. M.; SOLEDADE, M.; PEDRAS, C.; HOWLETT, B. J. The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 53, p. 1307–1318, 2005.
- GLIENKE-BLANCO, C. **Guignardia citricarpa** Kiely: **Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. 1999. 200p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- GODIO, R. P.; MARTÍN, J. F. Modified oxidosqualene cyclases in the formation of bioactive secondary metabolites: Biosynthesis of the antitumor clavarinic acid. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 232–242, 2009.
- GÓMEZ-VIDAL, S.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.-B.; SALINAS, J. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. **Micron**, Oxford, v. 37, p. 624–632, 2006.
- GONG, X.; FU, Y.; JIANG, D.; LI, G.; YI, X.; PENG, Y. L-Arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1368–1379, 2007.
- GORFER, M.; KLAUBAUF, S.; BANDIAN, D.; STRAUSS, J. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 850–855, 2007.
- GOUKA, R. J.; GERK, C.; HOOYKAAS, P. J.; BUNDOCK, P.; MUSTERS, W.; VERRIPS, C. T.; DE GROOT, M. J. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. **Nature Biotechnology**, London, v. 17, p. 598–601, 1999.

GRASSI, M. C. B.; RINCONES, J.; PEREIRA, G. A. G. Desenvolvimento de um sistema de transformação para o fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53, 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...SBG**, 2007. p. 50.

GRIBANOVSKI-SASSU, O.; FOPPEN, F. H. The carotenoids of the fungus *Epicoccum nigrum* Link. **Phytochemistry**, Oxford, v. 6, p. 907–909, 1967.

GRIMALDI, B.; RAAF, M.A.; FILETICI, P.; OTTONELLO, S.; BALLARIO, P. *Agrobacterium*-mediated gene transfer and enhanced green fluorescent protein visualization in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*: a first step towards truffle genetics. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 69–74, 2005.

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

GUNATILAKA, A. A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUPTA, A.; CHATTOO, B. B. A novel gene MGA1 is required for appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1157-1169, 2007.

GUPTA, A.; CHATTOO, B. B. Functional analysis of a novel ABC transporter *ABC4* from *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 278, p. 22-28, 2008.

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

HANIF, M.; PARDO, A.G.; GORFER, M.; RAUDASKOSKI, M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. **Current Genetics**, Berlin, v. 41, p. 183–188, 2002.

HASHEM, M.; ALI, E. H. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root rot of cotton seedlings. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 37, p. 283-297, 2004.

HEAD, I. M.; BAILEY, M. J. Environmental biotechnology: methodological advances spawn new concepts in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 14, p.245–247, 2003.

HELBER, N.; REQUENA, N. Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, London, v. 177, p. 537-548, 2007.

- HERD, S.; CHRISTENSEN, M. J.; SAUNDERS, K.; SCOTT, D. B.; SCHMID, J. Quantitative assessment of *in planta* distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. **Microbiology**, Reading, v. 143, p. 267–275, 1997.
- HERRE, E. A.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D. A.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; BUTLER, A.; VAN BAEL, S. A. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. **Ecology**, Brooklyn, v. 88, p. 550–558, 2007.
- HIGGINS, K. L.; ARNOLD, A. E.; MIADLIKOWSKA, J.; SARVATE, S. D.; LUTZONI, F. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 42, p. 543–555, 2007.
- HILTY, J.; SMULIAN, A. G.; NEWMAN, S. L. The *Histoplasma capsulatum* vacuolar ATPase is required for iron homeostasis, intracellular replication in macrophages and virulence in a murine model of histoplasmosis. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 70, p. 127–139, 2008.
- HINNEN, A.; HICKS, J. B.; FINK, G. R. Transformation of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 75, p. 1929–1923, 1978.
- HOF, C.; EISFELD, K.; WELZEL, K.; ANTELO, L.; FOSTER, A. J.; ANKE, H. Ferricrocin synthesis in *Magnaporthe grisea* and its role in pathogenicity in rice. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, p. 163–172, 2007.
- HOFFMAN, B.; BREUIL, C. Disruption of the subtilase gene, *albin1*, in *Ophiostoma piliferum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3898–3903, 2004.
- HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 743–749, 2002.
- HU, G.; ST LEGER, R. J. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 6383–6387, 2002.
- HUANG, C.; YANG, Q. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Trichoderma harzianum* with endochitinase gene *Chit37*. **Journal of Biotechnology**, London, v. 136S, p. S261–S268, 2008. Abstract.
- HUANG, H. C.; BREMER, E.; HYNES, R. K.; ERICKSON, R. S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, Orlando, v. 18, p. 270–276, 2000.
- HUSER, A.; TAKAHARA, H.; SCHMALENBACH, W.; O'CONNELL, R. Discovery of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, p. 143–156, 2009.

IDNURM, A, REEDY, J. L.; NUSSBAUM, J. C.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 420–429, 2004.

INGLIS, P. W.; ARAGÃO, F.J.L.; FRAZÃO, H.; MAGALHÃES, B.P.; VALADARES-INGLIS, M. C. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, p. 249-254, 2000.

ISSHIKI, A.; OHTANI, K.; KYO, M.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 768-773, 2003.

JEON, J.; PARK, S.-Y.; CHI, M.-H.; CHOI, J.; PARK, J.; RHO, H.-S.; KIM, S.; GOH, J. et al. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. **Nature Genetics**, London, v. 39, p. 561-565, 2007.

JOHNSON, L.J.; JOHNSON, R.D.; SCHARDL, C.L.; PANACCIONE, D. G. Identification of differentially expressed genes in the mutualistic association of tall fescue with *Neotyphodium coenophialum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 63, p. 305-317, 2003.

KAHMANN, R.; BASSE, C. REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 221–229, 1999.

KELLNER, E. M.; ORSBORN, K. I.; SIEGEL, E. M.; MANDEL, M.A.; ORBACH, M. J.; GALGANI, J. N. *Coccidioides posadasii* contains a single 1,3- β -glucan synthase gene that appears to be essential for growth. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 4, p. 111–120, 2005.

KEMAMI WANGUN, H. V.; HERTWECK, C. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 5, p. 1702–1705, 2007.

KEMAMI WANGUN, H. V.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C. Epicoccalone, a coumarin-type chymotrypsin inhibitor, and isobenzofuran congeners from an *Epicoccum* sp. associated with a tree fungus. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 2008, n. 22, p. 3781–3784, 2008.

KEMPPAINEN, M.; CIRCOSTA, A.; TAGU, D.; MARTIN, F.; PARDO, A. G. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 19–22, 2005.

KEMPPAINEN, M.; DUPLESSIS, S.; MARTIN, F.; PARDO, A. G. RNA silencing in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: gene knock-down of nitrate reductase results in inhibition of symbiosis with *Populus*. **Environmental Microbiology**, Oxford, 2009. In press.

KHANG, C. H.; PARK, S.-Y.; LEE, Y.-H.; KANG, S. A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 483–492, 2005.

KILPATRICK, J. A.; CHILVERS, G. A. Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 77, p. 497–508, 1981.

KLIMES, A.; NEUMANN, M. J.; GRANT, S. J.; DOBINSON, K. F. Characterization of the glyoxalase I gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 816–822, 2006.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite--what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 358-63, 2006.

KOOISTRA, R.; HOOYKAAS, P. J.; STEENSMA, H. Y. Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, Chichester, v. 21, p. 781–792, 2004.

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

KUNIK, T. et al. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 1871–1876, 2001.

KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. **Current Science**, Bangalore, v. 72, p. 331–334, 1997.

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

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M; CARNEIRO, V. T. (Org.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998, p. 93-109.

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

LAGOPODI, A.; RAM, A.; LAMERS, G.; PUNT, P.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; LUGTENBERG, B.; BLOEMBERG, G. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 172–179, 2002.

LARENA, I.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P. Effects of stabilizers on shelf-life of *Epicoccum nigrum* formulations and their relationship with biocontrol of postharvest brown rot by *Monilinia* of peaches. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.102, p. 570–582, 2007.

LARENA, I.; TORRES, R.; DE CAL, A.; LIÑÁN, M.; MELGAREJO, P.; DOMENICHINI, P.; BELLINI, A.; MANDRIN, J. F.; LICHOU, J.; OCHOA DE ERIBE, X.; USALL, J. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. **Biological Control**, Orlando, v. 32, p. 305-310, 2005.

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

LEAL, C. V.; MONTES, B. A.; MESA, A. C.; RUA, A. L.; CORREDOR, M.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, Abingdon, v. 42, p. 391-395, 2004.

LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHUTZ, A.; CHEN, S.; MITINA, G. V.; ZIMMERMANN, G.; SCHAIRER, H. U. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 111–119, 2004.

LEE, M. H.; BOSTOCK, R. M. *Agrobacterium* T-DNA-mediated integration and gene replacement in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. **Current Genetics**, Berlin, v. 49, p. 309-322, 2006.

LI, G.; ZHOU, Z.; LIU, G.; ZHENG, F.; HE, C. Characterization of T-DNA insertion patterns in the genome of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Current Genetics**, Berlin, v. 51, p. 233-243, 2007.

LI, H. M.; SULLIVAN, R.; MOY, M.; KOBAYASHI, D. Y.; BELANGER, F. C. Expression of a novel chitinase by the fungal endophyte in *Poa ampla*. **Mycologia**, Lancaster, v. 96, p. 526-536, 2004.

LI, L.; SCHMELZ, M.; KELLNER, E. M.; GALGIANI, J. N.; ORBACH, M. J. Nuclear labeling of *Coccidioides posadasii* with green fluorescent protein. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1111, p. 198-207, 2007.

LI, W.; ZHANG, Y. Z. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. **Acta Microbiologica Sinica**. Beijing, v. 45, p. 784-787, 2005. Abstract.

- LI, M.; GONG, X.; ZHENG, J.; JIANG, D.; FU, Y.; HOU, M. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, p. 323–329, 2005.
- LIMA, I. G. P. **Transformação genética dos fungos entomopatogênicos *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces tenuipes***. 2005. 113p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.
- LIMA, I. G. P.; DUARTE, R. T. D.; FURLANETO, L.; BARONI, C. H.; FUNGARO, M. H. P.; FURLANETO, M.C. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, p. 631–636, 2006.
- LIU, H.; BAO, X. Overexpression of the chitosanase gene in *Fusarium solani* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 279-282, 2009.
- LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, Lancaster, v. 88, p. 733–738, 1996.
- LOPPNAU, P.; TANGUAY, P.; BREUIL, C. Isolation and disruption of the melanin pathway polyketide synthase gene of the softwood deep stain fungus *Ceratocystis resinifera*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 33–41, 2004.
- LORANG, J. M.; TUORI, R. P.; MARTINEZ, J. P.; SAWYER, T. L.; REDMAN, R. S.; ROLLINS, J. A.; WOLPERT, T. J.; JOHNSON, K. B.; RODRIGUEZ, R. J.; DICKMAN, M. B.; CIUFFETTI, L. M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1987-1994, 2001.
- LORENZ, M. C. Genomic approaches to fungal pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 372-378, 2002.
- LU, Z. X.; TOMBOLINI, R.; WOO, S.; ZEILINGER, S.; LORITO, M.; JANSSON, J.K. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3073–3081, 2004.
- LÜBECK, M.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, B.; THRANE, U.; JANVIER, C.; JENSEN, D.F. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 815-826, 2002.
- LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 1109–1112, 2002.

LUNARDI, L. U.; FIER, C. B.; ASHIKAGA, F. Y.; MORIOKA, L. R.; FUNGARO, M. H. P. Obtenção de mutantes de *Aspergillus carbonarius* via transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 27, p. 95-104, 2006.

LYSØE, E.; KLEMSDAL, S. S.; BONE, K. R.; FRANDBSEN, R. J.; JOHANSEN, T.; THRANE, U.; GIESE, H. The PKS4 gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3924-3932, 2006.

McCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 904-913, 2005.

MACIÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H. B.; TALBOT, N. J.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 213-228, 2009.

MACIÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H. B.; MENDGEN, K.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Colonization of barley root by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, p. 600-609, 2008.

MACKINTOSH, J. A.; CHOI, H. Y.; BAE, S. H.; VEAL, D. A.; BELL, P. J.; FERRARI, B. C.; VAN DYK, D. D.; VERRILLS, N. M.; PAIK, Y. K.; KARUSO, P. A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, p. 2273-2288, 2003.

MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 923-940, 2000.

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

MAMARABADI, M.; JENSEN, B.; LÜBECK, M. Three endochitinase-encoding genes identified in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* are differentially expressed. **Current Genetics**, Berlin, v. 54, p. 57-70, 2008.

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

MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B. A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 491-496, 1998.

- MAPARI S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 30, p. 2183-2190, 2008.
- MARCH, J.C.; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Biotechnological applications of green fluorescent protein, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 303–315, 2003.
- MARCHAND, G.; FORTIER, E.; NEVEU, B.; BOLDUC, S.; BELZILE, F.; BÉLANGER, R. R. Alternative methods for genetic transformation of *Pseudozyma antarctica*, a basidiomycetous yeast-like fungus. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 519–527, 2007.
- MARI, M.; TORRES, R.; CASALINI, L.; LAMARCA, N.; MANDRIN, J. F.; LICHOU, J.; LARENA, I.; DE CAL, M. A.; MELGAREJO, P.; USALL, J. Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 1271–1277, 2007.
- MARION, C. L.; RAPPLEYE, C. A.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 62, p. 970-983, 2006.
- MÁRQUEZ, L. M.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J. A virus in a fungus in a plant—three way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, Washington, v. 315, p. 513–515, 2007.
- MARTINO, E.; MURAT, C.; VALLINO, M.; BENA, A.; PEROTTO, S.; SPANU, P. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express EGFP during ericoid endosymbiosis. **Current Genetics**, Berlin, v. 52, p. 65-75, 2007.
- MARUTHACHALAM, K.; NAIR, V.; RHO, H.-S.; CHOI, J.; KIM, S.; LEE, Y.-H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, p. 234–241, 2008.
- MATA, M. M.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, A. L.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 148-151, 2007.
- MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento*. Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.

- MENG, Y.; PATEL, G.; HEIST, M.; BETTS, M. F.; TUCKER, S. L.; GALADIMA, N.; DONOFRIO, N. M.; BROWN, D.; MITCHELL, T. K.; LI, L.; XU, J. R.; ORBACH, M.; THON, M.; DEAN, R. A.; FARMAN, M. L. A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1050-1064, 2007.
- MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 371–377, 2003.
- MICHIELSE, C.; HOOYKAAS, P.; VAN DEN HONDEL, C.; RAM, A. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1–17, 2005.
- MICHIELSE, C.B.; SALIM, K.; RAGAS, P.; RAM, A.F.J.; KUDLA, B.; JARRY, B.; PUNT, P.J.; HONDEL, C.A.M.J.J. van den. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Molecular and General Genomics**, v. 271, p. 499–510, 2004.
- MIKKELSEN, L.; SARROCCO, S.; LÜBECK, M.; JENSEN, D. F. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, p. 135-139, 2003.
- MIKOSCH, T.S.; LAVRIJSEN, B.; SONNENBERG, A.S.; GRIENSVEN, L.J van Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, Berlin, v. 39, p. 35–39, 2001.
- MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 83, p. 1354-1363, 2005.
- MISHRA, N. C.; TATUM, E. L. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, p. 3875–3879, 1973.
- MOCALI, S.; BERTELLI, E.; CELLI, F.D.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 105-114, 2003.
- MOGENSEN, E. G.; CHALLEN, M. P.; STRANGE, R. N. Reduction in solanapyrone phytotoxin production by *Ascochyta rabiei* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, p. 255–261, 2006.
- MONFORT, A.; CORDERO, L.; MAICAS, S.; POLAINA, J. Transformation of *Mucor miehei* results in plasmid deletion and phenotypic instability. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 224, p. 101–106, 2003.

- MOON, Y.-S.; DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B.; MCLANE, H.; GRIGGS, M. H.; COOKE, P.; VANDENBERG, J. D.; GIBSON, D. M.; CHURCHILL, A. C. L. *Agrobacterium*-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 4366–4380, 2008.
- MORIOKA, L. R. I.; FURLANETO, M. C.; BOGAS, A. C.; POMPERMAYER, P.; DUARTE, R. T. D.; VIEIRA, M. L. C.; WATANABE, M. A. E.; FUNGARO, M. H. P. Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 469–472, 2006.
- MOY, M.; LI, H. M.; SULLIVAN, R.; WHITE, J. F. Jr.; BELANGER, F. C. Endophytic fungal β -1,6-glucanase expression in the infected host grass. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1298–1308, 2002.
- MUCCIARELLI, M.; SCANNERINI, S.; BERTEA, C.; MAFFEI, M. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, London, v. 158, p. 579–591, 2003.
- MÜLLER, T.; BENJDIA, M.; AVOLIO, M.; VOIGT, B.; MENZEL, D.; PARDO, A.; FROMMER, W. B.; WIPF, D. Functional expression of the green fluorescent protein in the ectomycorrhizal model fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 437–442, 2006.
- MULLINS, E. D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, p. 2043–2052, 2001.
- MURALI, T. S.; SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATESAN, G. Fungal endophyte communities in two tropical forests of southern India: diversity and host affiliation. **Mycological Progress**, Berlin, v. 6, p. 191–199, 2007.
- MURATA, H.; SUNAGAWA, M.; YAMAZAKI, T.; SHISHIDO, K.; IGASAKI, T. Expression of the autofluorescent protein, DsRed2, in the recombinants of the ectomycorrhizal basidiomycete, *Suillus grevillei*, generated by *Agrobacterium* mediated transformation. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 407–412, 2006.
- MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 233, p. 1-9, 1992.
- NAKAYASHIKI, H.; NGUYEN, Q. B. RNA interference: roles in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.11, p. 494-502, 2008.
- NARISAWA, K.; KAWAMATA, H.; CURRAH, R. S.; HASHIBA, T. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 103–109, 2002.

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

NEVEU, B.; LABBÉ, C.; BÉLANGER, R. R. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: a case study with *Pseudozyma flocculosa*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 68, p. 275–281, 2007.

NGARI, C.; COMBIER, J. P.; DORÉ, J.; MARMEISSE, R.; GAY, G.; MELAYAH, D. The dominant *Hc Sdh* (R) carboxin-resistance gene of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* as a selectable marker for transformation. **Current Genetics**, Berlin, v. 55, p. 223–231, 2009.

NOBLE, J.A.; CROW, S. A.; AHEARNB, D.G.; KUHN, F.A. Allergic fungal sinusitis in the southeastern USA: involvement of a new agent *Epicoccum nigrum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 35, p. 405–409, 1997.

NYILASI, I. Investigation of the applicability of the *Agrobacterium*-mediated transformation in Zygomycetes. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 48, p. 73, 2004. Abstract.

NYILASI, I.; ÁCS, K.; PAPP, T.; NAGY, E.; VÁGVÖLGYI, C. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Mucor circinelloides*. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 50, p. 415–420, 2005.

NYILASI, I.; PAPP, T.; CSERNETICS, A.; VÁGVÖLGYI, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the zygomycete fungus *Bacillus lamprospora*. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 48, p. 59–64, 2008.

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

OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, L.; ANDRADE, C. J.; MARTIN, J. S.; FURLANETO, M. C. Alternative method for genetic transformation of *Candida* species using *Agrobacterium tumefaciens* system and a dominant selection marker. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5, 2007, Recife. **Resumos...Recife**, 2007. p. 100.

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

PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L.; LANGUIN, T.; DABOUSSI, M. J. Transformação de *Fusarium moniliforme* endofítico com o gene *gusA* e seu uso em estudos de colonização de raízes de milho. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, suppl., p. 296, 1997.

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

PANTELIDES, I. S.; TJAMOS, S. E.; STRIGLIS, I. A.; CHATZIPAVLIDIS, I.; PAPLOMATAS, E. J. Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 30-36, 2009.

PARDO, A. G.; HANIF, M.; RAUDASKOSKI, M.; GORFER, M. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 132–137, 2002.

PARDO, A. G.; KEMPPAINEN, M.; VALDEMOROS, D.; DUPLESSIS, S.; MARTIN, F.; TAGU, D. T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 37, p. 69-72, 2005.

PARK, S.-M.; KIM, D.-K. Transformation of a filamentous fungus *Cryphonectria parasitica* using *Agrobacterium tumefaciens*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 9, p. 217–222, 2004.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews in Microbiology**, London, v. 6, p. 763-775, 2008.

PELÁEZ, F.; COLLADO, F.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DIEZ MATAS, M. T.; GARCIA, J. B.; GONZALEZ DEL VAL, A.; GONZALEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNANDEZ, P.; MARTIN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 755–761, 1998.

PEREIRA, J. O.; CARNEIRO-VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 37-40, 1999.

PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q. L.; HANADA, R. E. Diversidade de microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia brasileira. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento*. Recife: UFPE, 2007. p. 141-148.

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

PIECKENSTAIN, F. L.; BAZZALO, M. E.; ROBERTS, A. M. I.; UGALDE, R. A. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 77-84, 2001.

- PIERS, K. L.; HEATH, J. D.; LIANG, X.; STEPHENS, M.; NESTER, E. W. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 1613-1618, 1996.
- PINTO, L. S. R. C.; AZEVEDO, J. L.; PEREIRA, J. O.; VIEIRA, M. L. C.; LABATE, C. A. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. **New Phytologist**, London, v. 147, p. 609-615, 2000.
- PLIEGO, C.; KANEMATSU, S.; RUANO-ROSA, D.; DE VICENTE, A.; LÓPEZ-HERRERA, C.; CAZORLA, F. M.; RAMOS, C. GFP sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 137-145, 2009.
- PÖGGELER, S.; HOFF, S.M.B.; MAYRHOFER, S.; KUCK, U. Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 54-61, 2003.
- PRASHER, D. C. Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, Amsterdam, v. 111, p. 229-233, 1992.
- PROMPUTTHA, I.; LUMYONG, S.; DHANASEKARAN, V.; MCKENZIE, E.; HYDE, K.; JEEWAN, R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 579-590, 2007.
- QUESADA-MORAGA, E.; LANDA, B. B.; MUÑOZ-LEDESMA, J.; JIMÉNEZ-DIÁZ, R. M.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 161, p. 323-329, 2006.
- RAO, Z.; MA, Z.; SHEN, W.; FANG, H.; ZHUGE, J.; WANG, X. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* that produces 1,3-propanediol from D-glucose. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.105, p. 1768-1776, 2008.
- RAUYAREE, P.; OSPINA-GIRALDO, M. D.; KANG, S.; BHAT, R. G.; SUBBARAO, K. V.; GRANT, S. J.; DOBINSON, K. F. Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 109-116, 2005.
- REDDY, P. V.; LAM, C. K.; BELANGER, F. C. Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 1209-1218, 1996.
- REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, London, v. 151, p. 705-716, 2001.

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

REIS, M.C.; FUNGARO, M.H.P.; DUARTE, R.T.D.; FURLANETO, L.; FURLANETO, M.C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, 197–202, 2004.

REITER, B.; SESSITSCH, A. Bacterial endophytes of the wildflower *Crocus albiflorus* analyzed by characterization of isolates and by a cultivation-independent approach. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 140–149, 2006.

REMY, E.; MEYER, M.; BLAISE, F.; CHABIRAND, M.; WOLFF, N.; BALESSENT, M. H.; ROUXEL, T. The *Lmpmal* gene of *Leptosphaeria maculans* encodes a plasma membrane H⁺-ATPase isoform essential for pathogenicity towards oilseed rape. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 122–1134, 2008.

RHO, H. S.; KANG, S.; LEE, Y. H. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 12, p. 407–411, 2001.

RODRIGUEZ, R.; HENSON, J.; VAN VOLKENBURGH, E.; HOY, M.; WRIGHT, L.; BECKWITH, F.; KIM, Y.; REDMAN, R. S. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 404-416, 2008.

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

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

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

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

ROLLAND, S.; JOBIC, C.; FÈVRE, M.; BRUEL, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current Genetics**, Berlin, v. 44, p. 164-171, 2003.

- ROMÃO, A. S.; MENDES, R.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar geneticamente modificada. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 25., 2006, São Pedro. **Resumos...** Piracicaba: Esalq, 2006. p. 122.
- ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 827–837, 2006.
- RUIZ-DIEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 189–195, 2002.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 278, p. 1–9, 2008.
- SADAKA, N.; PONGE, J. F. Fungal colonization of phyllosphere and litter of *Quercus rotundifolia* Lam. in a holm oak forest (High Atlas, Morocco). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 9, p. 30–36, 2003.
- SAIKKONEN, K. Forest structure and fungal endophytes. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 67–74, 2007.
- SAMILS, N.; ELFSTRAND, M.; CZEDERPILTZ, D. L. L.; FAHLESON, J.; OLSON, A.; DIXELIUS, C.; STENLID, J. Development of a rapid and simple *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system for the fungal pathogen *Heterobasidion annosum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, p. 82–88, 2006.
- SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, New York, v.50, p. 1–8, 2005.
- SARROCCO, S.; MIKKELSEN, L.; VERGARA, M.; JENSEN, D. F.; LÜBECK, M.; VANNACCI, G. Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. **Mycological research**, Cambridge, v. 110, p. 179-187, 2006.
- SCHÄFER, P.; KHATABI, B.; KOGEL, K. H. Root cell death and systemic effects of *Piriformospora indica*: a study on mutualism. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 275, p. 1-7, 2007.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 315–340, 2004.
- SCHMID, F.; STONE, B. A.; BROWNLEE, R. T. C.; MCDUGALLD, B. M.; SEVIOUR, R. J. Structure and assembly of epiglucan, the extracellular β -glucan produced by the fungus *Epicoccum nigrum* strain F19. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 341, p. 365–373, 2006.
- SCHOL-SCHWARZ, M. B. The genus *Epicoccum* Link. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 42, p. 149–173, 1959.

- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 996-1004, 2002.
- SCHULZ, B.; GUSKE, S.; DAMMANN, U.; BOYLE, C. Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. **Symbiosis**, Rehovot, v. 25, p. 213-227, 1998.
- SCHULZ, B.; ROMMERT, A. K.; DAMMANN, U.; AUST, H. J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Cambridge, v. 10, p. 1275-1283, 1999.
- SELOSSE, M. A.; VOHNÍK, M.; CHAUVET, E. Out of the rivers: are some aquatic hyphomycetes plant endophytes? **New Phytologist**, London, v. 178, p. 3-7, 2008.
- SERFLING, A.; WIRSEL, S. G. R.; LIND, V.; DEISING, H. B. Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 523-531, 2007.
- SHARMA, K. K.; GUPTA, S.; KUHAD, R. C. *Agrobacterium*-mediated delivery of marker genes to *Phanerochaete chrysosporium* mycelial pellets: a model transformation system for white-rot fungi. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 43, p. 181-186, 2006.
- SHEN, W. F.; WENG, H. B.; NIU, B. L.; HE, L. H.; LIU, Y.; QI, X. P.; MENG, Z. Q. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the pathogen of *Botrytis cinerea* **Yi Chuan**, Hong Kong, v. 30, p. 515-520, 2008. Abstract.
- SHU, Y. Z.; YE, Q.; LI, H.; KADOW, K. F.; HUSSAIN, R. A.; HUANG, S.; GUSTAVSON, D. R.; LOWE, S. E.; CHANG, L. P.; PIRNIK, D. M.; KODUKULA, K. Orevactaene, a novel binding inhibitor of HIV-1 rev protein to Rev response element (RRE) from *Epicoccum nigrum* WC47880. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 7, p. 2295-2298, 1997.
- SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 75-89, 2007.
- SINGH, A.; SHARMA, J.; REXER, K.-H.; VARMA, A. Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica* – A revolutionary plant growth promoting fungus. **Current Science**, Bangalore, v. 79, p. 1548-1554, 2000.
- SIRRENBERG, A.; GÖBEL, C.; GROND, S.; CZEMPINSKI, N.; RATZINGER, A.; KARLOVSKY, P.; SANTOS, P.; FEUSSNER, I.; PAWLOWSKIA, K. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 131, p. 581-589, 2007.

SKADSENA, R. W.; HOHN, T. M. Use of *Fusarium graminearum* transformed with gfp to follow infection patterns in barley and *Arabidopsis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, p. 45–53, 2004.

SMITH S. A.; TANK D. C.; BOULANGER L. A.; BASCOM-SLACK, C. A.; EISENMAN, K.; et al. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, 2008. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0003052>. Acesso em: 20 fev. 2009.

SOLTANI, J.; VAN HEUSDEN, G.P.H.; HOOYKAAS, P.J.J. (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of non-plant organisms. In: TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. (Ed.). **Agrobacterium: From biology to biotechnology**. New York:Springer, 2008, chap. 18, p. 649-675.

ȘOPTICĂ, F.; BAHRIM, G. Influence of light upon flavonoid yields in *Epicoccum nigrum* solid state fermentation. **Roumanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 10, p. 2387-2394, 2005.

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

SPIERING, M. J.; MOON, C. D.; WILKINSON, H. H.; SCHARDL, C. L. Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. **Genetics**, Bethesda, v. 169, p. 1403–1414, 2005.

SPIERING, M. J.; WILKINSON, H. H.; BLANKENSHIP, J. D.; SCHARDL, C. L. Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte *Neotyphodium uncinatum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 36, p. 242–254, 2002.

STAATS, C. C.; JUNGES, A.; FITARELLI, M.; FURLANETO, M. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, p. 945–950, 2007.

STOHR, S. N.; DIGHTON, J. Effects of species diversity on establishment and coexistence: a phylloplane fungal community model system. **Microbial Ecology**, New York, v. 48, p. 431–438, 2004.

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

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

- STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Science**, London, v. 19, p. 1-30, 2000.
- SUGUI, J. A.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1798–1802, 2005.
- SULLIVAN, T. D.; ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 1, p. 895–905, 2002.
- SUN, C. B.; KONG, Q. L.; XU, W. S. Efficient transformation of *Penicillium chrysogenum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 5, p. 21-28, 2002.
- TAKAHARA, H.; TSUJI, G.; KUBO, Y.; YAMAMOTO, M.; TOYODA, K.; INAGAKI, Y.; ICHINOSE, Y.; SHIRAIISHI, T. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 70, p. 93–96, 2004.
- TAKANO, Y.; OSHIRO, E.; OKUNO, T. Microtubule dynamics during infection-related morphogenesis of *Colletotrichum lagenarium*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 34, p. 107–121, 2001.
- TALHINHAS, P.; MUTHUMEENAKSHI, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H.; SREENIVASAPRASAD, S. *Agrobacterium*-mediated transformation and insertional mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for investigating varied pathogenicity lifestyles. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 39, p. 57–67, 2008.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 8, p. 448–459, 2001.
- TAN, Y. Y.; SPIERING, M. J.; SCOTT, V.; LANE, G. A.; CHRISTENSEN, M. J.; SCHMID, J. *In planta* regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5377–5383, 2001.
- TANAKA, A.; CHRISTENSEN, M. J.; TAKEMOTO, D.; PARK, P.; SCOTT, B. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. **Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1052-1066, 2006.
- TANAKA, A.; TAPPER, B.A.; POPAY, A.; PARKER, E.J.; SCOTT, B. A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 57, p. 1036–1050, 2005.

TANGUAY, P.; BOZZA, S.; BREUIL, C. Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. piceae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 804-812, 2006.

TANGUAY, P.; TANGEN, K.; BREUIL, C. Identifying pigmentation related genes in *Ophiostoma piceae* using *Agrobacterium*-mediated integration. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 1040-1048, 2007.

THERON, J.; CLOETE, T. E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 26, p. 37-57, 2000.

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

TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAIISHI, T.; KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, p. 230-239, 2003.

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

TZFIRA, T. et al. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 20, p. 375-383, 2004.

TUCKER, S. L.; ORBACH, M. J. *Agrobacterium*-mediated transformation to create an insertion library in *Magnaporthe grisea*. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 354, p. 57-68, 2007.

TUDZYNSKI, P.; HOLTER, K.; CORREIA, T.; ARNTZ, C.; GRAMMELL, N.; KELLER, U. Genetics of alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: evidence for a gene cluster. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, v. 46, suppl., p. 140, 1999.

UTERMARK, J.; KARLOVSKY, P. Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 637-642, 2007.

VANDENKOORNHUYSE, P.; MAHÉ, S.; INESON, P.; STADDON, P.; OSTLE, N.; CLIQUET, J. B.; FRANCEZ, A. J.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P.W. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 16970-16975, 2007.

- van der DOES, H. C.; DUYVESTEIJN, R. G. E.; GOLTSTEIN, P. M.; VAN SCHIE, C. C. N.; MANDERS, E. M. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M. Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. **Fungal genetics and biology**, Orlando, v. 45, p. 1257-1264, 2008.
- VAN-HEESWIJCK, R.; MCDONALD, G. *Acremonium* endophyte in perennial ryegrass and other pasture grasses in Australia and New Zealand. **Australian Journal of Agriculture Research**, Sydney, v. 43, p. 1683-1709, 1992.
- VARMA, A.; VERA, S.; SAHAY, N.; BÜTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.
- VEGA, F. E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 98, p. 277–279, 2008.
- VEGA, F. E.; POSADA, F.; AIME, M. C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S. A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 72–82, 2008.
- VIJN, I.; GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 459–467, 2003.
- VIRET, O.; SCHEIDEGGER, C.; PETRINI, O. Infection of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomoni aerrabunda*): low temperature scanning electron microscopy studies. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, p. 1520-1527, 1993.
- WAGNER, B. L.; LEWIS, L. C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3468–3473, 2000.
- WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 13386–13391, 2005.
- WALLER, F.; MUKHERJEE, K.; DESHMUKH, S. D.; ACHATZ, B.; SHARMA, M.; SCHÄFER, P.; KOGEL, K.-H. Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, p. 60-70, 2008.
- WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 57, p. 1381-1386, 2005.

WANG, J.; GUO, L.; ZHANG, K.; WUA, Q.; LIN, J. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Volvariella volvacea*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 8524–8527, 2008.

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

WANG, J.; MACHADO, C.; PANACCIONE, D.; SCHARDL, C. Ergot alkaloid biosynthesis genes cloned from *Claviceps* and *Balansia*. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, v. 46, suppl., p. 120, 1999.

WANGUN, H. V.; DAHSE, H. M.; HERTWECK, C. Epicoccamides B-D, glycosylated tetramic acid derivatives from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, p. 1800-1803, 2007.

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

WEBSTER, R.; PACEY, M.; WINCHESTER, T.; JOHNSON, P.; JEZEQUEL, S. Microbial oxidative metabolism of diclofenac: production of 4'-hydroxydiclofenac using *Epicoccum nigrum* IMI354292. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, p. 371-376, 1998.

WEI, X.; ZHU, C.; ZHU, B. An efficient and stable method for the transformation of heterogeneous genes into *Cephalosporium acremonium* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 15, p. 683-688, 2005.

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

WELD, R. J.; PLUMMER, K. M.; CARPENTER, M. A.; RIDGWAY, H. J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. **Cell Research**, Hong Kong, v. 16, p. 31-44, 2006.

WHITE, D.; CHEN, W. Genetic transformation of *Ascochyta rabiei* using *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, Berlin, v. 49, p. 272–280, 2006.

WHITE, D.; CHEN, W. Towards identifying pathogenic determinants of the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 3–12, 2007.

WICKLOW, D. T.; POLING, S. M. Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 109-115, 2009.

WRIGHT, A. D.; OSTERHAGE, C.; KÖNIG, G. M. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish derived culture of *Epicoccum purpurascens*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 1, p. 507-510, 2003.

XU, Y.; OROZCO, R.; KITHSIRI WIJERATNE, E.M.; ESPINOSA-ARTILES, P.; GUNATILAKA, A. A. L.; STOCK, S. P.; MOLNÁR, I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 353-364, 2009.

XING-XI, G.; QIAN, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Chaetomium globosum* and its T-DNA insertional mutagenesis. **Acta Microbiologica Sinica**, Beijing, v. 45, p. 129-131, 2005. Abstract.

YANG, Q.; YANG, L.; LIU, P.-G.; LI, S.; SONG J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Trichoderma harzianum*. **KMITL Science Technology Journal**, Ladkrabang, v. 7, p. 185-191, 2007. Abstract.

YANG, Y.-J.; INHYUNG, L. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Monascus rubber*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, p. 754–758, 2008.

YAMADA, T.; MAKIMURA, K.; SATOH, K.; UMEDA, Y.; ISHIHARA, Y.; ABE, S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*: an efficient tool for gene transfer. **Medical Mycology**, Abingdon, v. 27, p. 1-10, 2008.

YEH, Y.-L.; LIN, Y.-S.; SU, B.-J.; SHEN, W.-C. A screening for suppressor mutants reveals components involved in the blue light-inhibited sexual filamentation in *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 42–54, 2009.

YOUNG, C.; MCMILLAN, L.; SCOTT, B. Molecular cloning of an indole-diterpenoid gene cluster from *Penicillium paxilii*. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, v. 46, suppl., p. 121, 1999.

YOUNG, C.A.; TAPPER, B.A.; MAY, K.; MOON, C.D.; SCHARDL, C.L.; SCOTT, B. Indole-diterpene biosynthetic capability of epichloë endophytes as predicted by ltm gene analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 2200-2211, 2009.

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

ZHANG, A.; LU, P.; DAHL-ROSHAK, A.M.; PARESS, P.S.; KENNEDY, S.; TKACZ, J.S.; AN, Z. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (pks1) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 268, p. 645–655, 2003.

ZHANG, L.; YANG, J.; NIU, Q.; ZHAO, X.; YE, F.; LIANG, L.; ZHANG, K.-Q. Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 78, p. 983–990, 2008.

ZHANG, N.; SCOTT, V.; AL-SAMARRAI, T. H.; TAN, Y. Y.; SPIERING, M. J.; MCMILLAN, L. K.; LANE, G. A.; SCOTT, D. B.; CHRISTENSEN, M. J.; SCHMID, J. Transformation of the ryegrass endophyte *Neotyphodium lolii* can alter its *in planta* mycelial morphology. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 601–611, 2006.

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

ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, X. Epicoccins A–D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, p. 1522–1525, 2007.

ZHIMING, R.; ZHENG, M.; WEI, S.; HUIYING, F.; JIAN, Z. Transformation of industrialized strain *Candida glycerinogenes* with resistant gene zeocin via *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Microbiology**, New York, v. 57, p. 12–17, 2008.

ZHONG, Y. H.; WANG, T. H.; WANG, X. L.; ZHANG, G. T.; YU, H. N. Identification and characterization of a novel gene, TrCCD1, and its possible function in hyphal growth and conidiospore development of *Trichoderma reesei*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 255–263, 2009.

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

ZHOU, T.; REELEDER, R. D. Application of *Epicoccum purpurascens* spores to control white mold of snap bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 639–642, 1989.

ZHOU, T.; REELEDER, R. D.; SPARACE, S. A. Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and *Epicoccum purpurascens*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, p. 2503–2510, 1991.

ZWIERS, L. H.; DE WAARD, M. A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetics**, Berlin, v. 39, p. 388–393, 2001.

2 DIFERENCIAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR *Epicoccum nigrum* POR MEIO DE ABORDAGEM POLIFÁSICA

Resumo

O fungo endofítico *Epicoccum nigrum* (sin.: *Epicoccum purpurascens*) é uma espécie anamórfica que produz conídios muriformes de pigmentação escura a partir de conidióforos curtos sobre uma estrutura denominada esporodóquio e de acordo com a variação morfológica e genética, *E. nigrum* apresenta dois genótipos, os quais podem representar mais que uma espécie. Este fungo é uma espécie cosmopolita e o potencial para o controle biológico de muitos fitopatógenos bem como a produção de metabólitos secundários tem sido descrita. No presente trabalho, foi utilizada uma abordagem que combinou dados moleculares (seqüências de ITS e β -tubulina, IGS-RFLP e marcadores AFLP), morfométricos, fisiológicos e de compatibilidade vegetativa para estudar as relações taxonômicas dentro de uma população que tem sido identificada como *E. nigrum*. Esta análise combinada distinguiu dois genótipos que mostraram divergência morfológica e genética bem como incompatibilidade genética caracterizada pela inibição das colônias, fortemente indicando que estes genótipos correspondem a espécies diferentes. O genótipo I corresponde a *E. nigrum*, enquanto que o genótipo II representa uma nova espécie, aqui denominada *Epicoccum* sp.

Palavras-chave: ITS1-5,8S-ITS2; β -tubulina; IGS-RFLP; AFLP; Variabilidade genética; Compatibilidade vegetativa; Enzima hidrolítica; Variação morfológica; *Saccharum officinarum*.

2 DIFFERENTIATION OF THE SUGARCANE ENDOPHYTIC FUNGUS *Epicoccum nigrum* THROUGH POLYPHASIC APPROACH

Abstract

The endophyte *Epicoccum nigrum* (sin.: *Epicoccum purpurascens*) is an anamorphic fungus that produce darkly pigmented muriform conidia on short conidiophores on sporodochium and according to morphological and genetic variation, *E. nigrum* present two genotypes, which may comprises more than one species. This fungus is worldwide distributed and the potential for biological control of many plant pathogens as well as production of secondary metabolites have been described. We report the application of combined molecular (ITS and β -tubulin gene sequence; IGS-RFLP and AFLP techniques), morphometric, physiological and genetic compatibility approach to study the taxonomic interrelationships within a population that has been identified as *E. nigrum*. This combined analysis distinguishes two genotypes showed morphological and genetic divergence as well as genetic incompatibility characterized by colony inhibition, strongly indicating that these genotypes correspond to different species. Genotype I correspond to *E. nigrum*, while genotype II represent a new species, here called *Epicoccum* sp.

Keywords: ITS1-5,8S-ITS2; β -tubulin; IGS-RFLP; AFLP; Genetic variability; Vegetative compatibility; Hydrolytic enzyme; Morphological variation; *Saccharum officinarum*.

2.1 Introdução

Fungos endofíticos são encontrados nos tecidos vegetais de todas as espécies conhecidas de plantas (ARNOLD, 2007). Os microrganismos endofíticos são todos aqueles que podem ou não crescer em meio de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Esta definição não inclui os formadores de nódulos, como bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, nem os fungos micorrízicos. Dessa maneira, Mendes e Azevedo (2007) dividiram os endófitos em dois tipos: a) Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta e; b) Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. A distinção entre endófitos, epífitos e fitopatógenos é considerada de caráter didático. Existe um gradiente de interações que depende não somente da adaptação e especificidade a um hospedeiro, mas também do estágio de desenvolvimento das partes envolvidas, da virulência inata do fungo, das respostas de defesa da planta e das condições ambientais que permeiam a interação (SAIKKONEN et al., 1998; SCHULZ; BOYLE, 2005; HYDE; SOYTONG, 2008).

A importância dos fungos endofíticos é amplamente reconhecida, pois podem conferir proteção contra insetos herbívoros e patógenos (AZEVEDO et al., 2000; ARNOLD et al., 2003; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004; WALLER et al., 2005), tolerância a estresses abióticos, como acidez do solo e estresse hídrico (MALINOWSKI; BELESKY, 2000) e tolerância a altas temperaturas em solos termais (REDMAN et al., 2002; MÁRQUEZ et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2008). Além disso, podem produzir fitormônios (NASSAR; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2005; SIRRENBERG et al., 2007) e promover o crescimento vegetal (VARMA et al., 1999; MUCCIARELLI et al., 2003; ERNST; MENDGEN; WIRSEL, 2003; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). Estes fungos também estão envolvidos na produção de compostos de interesse biotecnológico como enzimas (LUMYONG et al., 2002; TORRES et al., 2003) e metabólitos secundários com atividade antimicrobiana (PELÁEZ et al., 1998; TAN; ZOU, 2001; SCHULZ et al., 2002; STROBEL; DAISY, 2003; SMITH et al., 2008).

Estas propriedades foram relatadas em sua maioria a partir de endófitos de hospedeiros de clima temperado. Neste aspecto, o fato de que a diversidade fúngica é maior em plantas tropicais do que em regiões temperadas (ARNOLD; LUTZONI, 2007) justifica a realização de estudos sobre a comunidade endofítica que permitam um melhor entendimento das interações nas

condições tropicais. Exemplos de estudos sobre a ocorrência e diversidade de endófitos em plantas de clima tropical e subtropical são revisados por Mendes e Azevedo (2007) e por Pereira et al. (2007). Tais investigações têm levado a descrição de novas espécies de fungos (WEI; XU, 2004; PETERSON et al., 2005; ARENAL; PLATAS; PELÁEZ, 2007), demonstrando a importância desta análise para o conhecimento e prospecção de uso da diversidade fúngica.

Em relação à cultura da cana-de-açúcar, o Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial, com cerca de 446 milhões de toneladas na safra 2006 e com a possibilidade de dobrar essa produção em poucos anos para produção de açúcar e álcool. A produtividade da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo é 20% a 30% superior à produtividade observada na Austrália, país que ocupa o segundo lugar. As razões para esta eficiência na produtividade são a grande experiência e a alta tecnologia utilizadas na produção de cana-de-açúcar, a qual é responsável pela redução dos custos e aumento da produção (ARAÚJO; KUKLINSKY-SOBRAL, 2004).

Apesar da importância desta cultura para o Brasil, poucos estudos sobre a comunidade de fungos associados à cana-de-açúcar foram realizados (AZEREDO et al., 1998). Em recente avaliação da comunidade de fungos endofíticos de *S. officinarum*, Stuart (2006) e Romão e Araújo (2007) verificaram, por meio de isolamento e técnicas independentes de cultivo, que o fungo *Epicoccum nigrum* está presente de forma consistente em tecidos de cana-de-açúcar. Por ser uma espécie comumente encontrada em associação com esta cultura, o conhecimento da estrutura populacional de *E. nigrum* e da simbiose com a planta, pode contribuir para o entendimento sobre a plasticidade da interação entre fungos endofíticos e plantas tropicais.

E. nigrum Link é uma espécie cosmopolita encontrada em solos e em vários habitats naturais onde atua como decompositor primário de tecidos vegetais. Geralmente é considerado saprofítico primário, embora tenha sido descrito como patógeno fraco em certas plantas como descrito em *Cucumis melo* (BRUTON et al., 1993). *E. nigrum* é um fungo ascomiceto mitospórico (Leptosphaeriaceae) que produz conídios muriformes de pigmentação escura a partir de conidióforos desenvolvidos na superfície de um esporodóquio (MIMS; RICHARDSON, 2005). Aproximadamente 70 espécies de *Epicoccum* têm sido descritas, mas a maioria delas foi reduzida à sinonímia por Schol-Schwarz (1959). De acordo com Hawksworth et al. (1995), o gênero compreende duas espécies, *E. nigrum* e *E. andropogonis*.

Diversos produtos naturais biologicamente ativos têm sido caracterizados a partir deste fungo, indicando que o gênero *Epicoccum* apresenta metabolismo secundário altamente

desenvolvido e diverso. Entre os metabólitos secundários de interesse biotecnológico destacam-se vários pigmentos carotenóides (GRIBANOVSKI-SASSU; FOPPEN, 1967; BAHRIM; ŞOPTICĂ, 2004; MAPARI; MEYER; THRANE, 2008) e flavonóides (ŞOPTICĂ; BAHRIM, 2005) com atividade antioxidante (BLEOJU; GONZÁLEZ SANJOSÉ, 2007). Um composto fluorescente denominado epicocconona foi isolado de *E. nigrum* (BELL; KARUSO, 2003) e constitui um novo fluoróforo para coloração de membranas de células vivas (CHOI; VEAL; KARUSO, 2006), sendo comercialmente disponível como LavaCell™ (ActiveMotif). Além disso, este composto também é utilizado para detecção de proteínas em géis de eletroforese uni e bidimensional (MACKINTOSH et al., 2003; COGHLAN; MACKINTOSH; KARUSO, 2005), sendo comercializado como Deep Purple™ Total Protein Stain (GE Healthcare).

Metabólitos secundários com atividade antimicrobiana também foram isolados a partir de *Epicoccum*, entre eles os antibacterianos epicorazinas A-B (BAUTE et al., 1978), epicoccinas A-D (ZHANG et al., 2007), epicoccarinas A-B e epipiridona (KEMAMI WANGUN; HERTWECK, 2007), bem como os antifúngicos flavipina (BAMFORD; NORRIS; WARD, 1961) e epirodina (IKAWA et al., 1978). Além disso, *Epicoccum* também produz antioxidantes como isobenzofuranona (ABDEL-LATEFF et al., 2003), o composto orevactaeno, o qual inibe a replicação de HIV-1 (SHU et al., 1997), um novo inibidor de protease do tipo quimotripsina, epicoccalona (KEMAMI WANGUN; ISHIDA; HERTWECK, 2008), os compostos epicoccamidas B-D, com atividade antiproliferativa contra linhagens celulares de leucemia humana (WANGUN; DAHSE; HERTWECK, 2007), e outros metabólitos secundários como epicoccamida (WRIGHT; OSTERHAGE; KÖNIG, 2003). *E. nigrum* também é capaz de produzir sideróforos (FREDERICK et al., 1981) e exopolissacarídeos de interesse industrial, como beta-glicanas (SCHMID et al., 2006). Além disso, apresenta capacidade biocatalítica de xenobióticos (WEBSTER et al., 1998) e de biotransformação de acetofenonas (ANDRADE et al., 2004).

A atividade antagonista de *E. nigrum* frente a fungos fitopatogênicos e sua utilização no biocontrole é bastante conhecida. Este fungo tem sido extensivamente avaliado no controle de *Monilinia laxa* em pêssego e nectarina (MELGAREJO; CARRILLO; SAGASTA, 1985, 1986; MADRIGAL; TADEO; MELGAREJO, 1991; MADRIGAL; PASCUAL; MELGAREJO, 1994; MADRIGAL; MELGAREJO, 1995; PASCUAL; MELGAREJO; MAGAN, 2002; LARENA et al., 2003; LARENA; MELGAREJO, 2004; LARENA et al., 2005; LARENA; DE CAL; MELGAREJO, 2007; MARI et al., 2007; DE CAL et al., 2009), de *Sclerotinia sclerotiorum* em

feijão e girassol (ZHOU; REELEDER, 1989; ZHOU; REELEDER; SPARACE, 1991; HUANG et al., 2000; PIECKENSTAIN et al., 2001), *Phyitium* em algodão (HASHEM; ALI, 2004) e *Diplodia corticola* em *Quercus* sp. (CAMPANILE; RUSCELLI; LUISI, 2007).

Apesar do grande potencial biotecnológico, poucos estudos têm avaliado a diversidade genética desta espécie. Kilpatrick e Chilvers (1981) investigaram populações naturais de *E. purpurascens* e encontraram elevada variabilidade morfológica e fisiológica, como coloração da colônia, produção de enzimas extracelulares e capacidade de antagonismo, entre 2000 isolados provenientes de amostras de ar e de plantas de uma mesma região geográfica. Em um dos poucos estudos moleculares sobre a diversidade de *E. nigrum* (ARENAL et al., 1999), várias técnicas moleculares baseadas em fingerprint de DNA foram empregadas para acessar a variabilidade genética de um grupo de linhagens provenientes de diferentes substratos e ecossistemas, em comparação com diferentes técnicas fenotípicas (ARENAL et al., 2002), verificando também extensa variabilidade e ausência de correlação entre região geográfica e similaridade genética.

E. nigrum é uma espécie característica da comunidade epifítica das folhas (PERELLÓ; SIMON; ARAMBARRI, 2002; SADAKA; PONGE, 2003; KAWAMATA; NARISAWA; HASHIBA, 2004; STOHR; DIGHTON, 2004), no entanto, este fungo também tem sido reportado como endófito em várias espécies de plantas (FISHER; PETRINI, 1992; JOHNSTON, 1998; BETTUCCI; ALONSO; TISCORNIA, 1999; WIRSEL et al., 2001; LARRAN et al., 2002; DANTI et al., 2002; LARRAN et al., 2007). Como pode ser observado, este fungo apresenta grande potencial biotecnológico, tanto para a produção de metabólitos como para controle biológico, mas pouco é conhecido sobre a natureza da interação endofítica com hospedeiros de clima tropical, bem como sua função durante a interação com a planta hospedeira. Além disso, ainda não foram realizados estudos sobre a variabilidade genética e potencial biotecnológico de isolados desta espécie no Brasil.

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivos caracterizar isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar por meio de abordagem polifásica, incluindo caracterização morfocultural, fisiológica e ocorrência de compatibilidade micelial. Além disso, este estudo objetivou acessar a variabilidade dos isolados por meio de marcadores AFLP, análise de restrição das regiões ITS1-5,8-ITS2 e IGS do DNA ribossômico e análise filogenética com base nas seqüências parciais dos genes ITS e β -tubulina. A diferenciação dos isolados de *Epicoccum* em taxa distintos é discutida com base na análise combinada dos dados moleculares.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Isolamento de *Epicoccum* de folhas e raízes de cana-de-açúcar

Para o isolamento de fungos endofíticos foram utilizadas duas variedades (uma comercial e outra geneticamente modificada) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) (Tabela 2.1). 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). O delineamento experimental foi o de blocos inteiramente casualizados com três tratamentos (cada tratamento contendo três linhas de cinco metros) e quatro repetições, totalizando 12 parcelas, sendo analisadas posteriormente quatro plantas (repetições) por tratamento/parcela. Os tratamentos foram: 1) cana-de-açúcar geneticamente modificada + aplicação do herbicida imazapir em pré-plantio; 2) cana-de-açúcar convencional + capina e 3) cana-de-açúcar geneticamente modificada + capina (Figura 2.1).

O isolamento foi realizado em 03 de outubro de 2006, trinta meses após o plantio e sessenta dias após a poda das plantas, quando a soqueira já estava em rebrota. Para tanto, as plantas 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 saudáveis de cana-de-açúcar após a seguinte seqüência de imersão: etanol 70% por 60s; hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo acrescido de tween 80 (1mL.L⁻¹) por 90s; novamente em etanol 70% por 60s e duas lavagens em água esterilizada. O mesmo procedimento foi utilizado para o isolamento a partir das raízes, modificando apenas o tempo de imersão em hipoclorito de sódio (180s ao invés de 90s). As folhas e raízes foram cortadas em fragmentos de 50mm² com auxílio de um estilete sobre placa de Petri esterilizada. Em seguida, sete fragmentos vegetais foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar, Difco) acrescido dos antibióticos tetraciclina (50 µg.mL⁻¹) e penicilina (50 µg.mL⁻¹) para impedir o crescimento de bactérias. Com a finalidade de avaliar a eficiência do processo de desinfecção, uma alíquota de 100 µL da água utilizada na última lavagem foi semeada sobre meio PDA. As placas foram mantidas a 28°C e avaliadas durante 30 dias e colônias morfológicamente similares à *Epicoccum* sp. foram coletadas, purificadas e estocadas para análises posteriores.

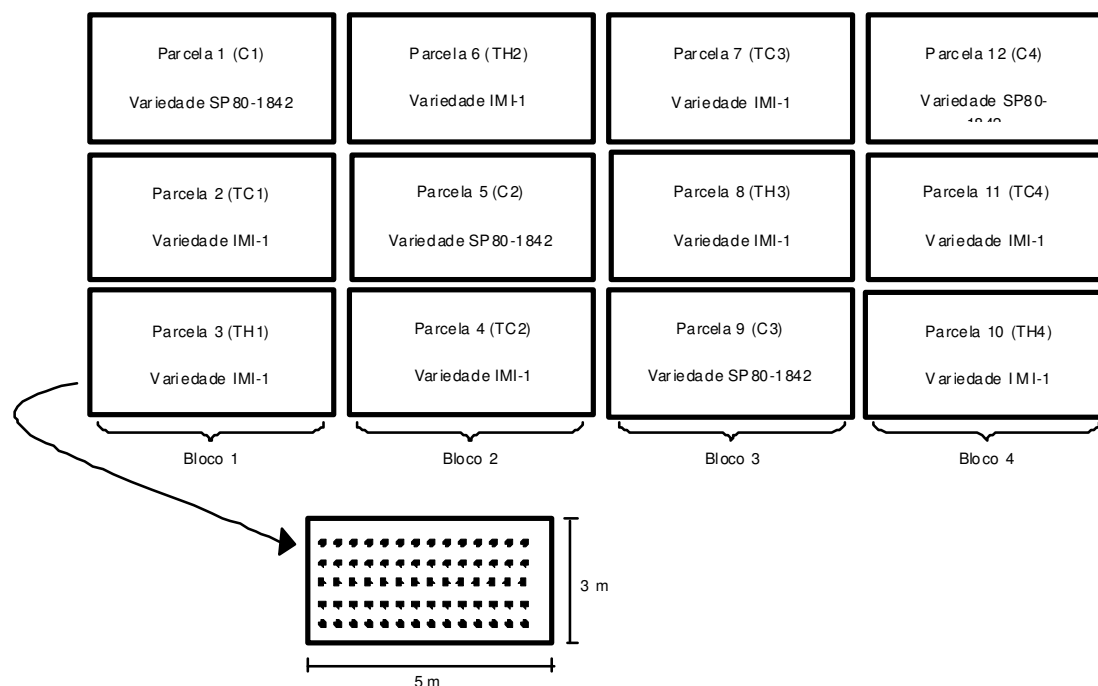


Figura 2.1 – Esquema do delineamento experimental considerando três tratamentos e quatro repetições montados em blocos inteiramente casualizados em um total de 12 parcelas contendo cinco linhas de cana-de-açúcar. A bordadura foi realizada com a variedade convencional SP80-1842 e a área total utilizada de 0,08 ha

Tabela 2.1 - Características das plantas utilizadas no presente trabalho

Variedade	Espécie	CARACTERÍSTICAS
IMI-01	<i>Saccharum</i> sp.	Variedade SP80-1842, geneticamente modificada para a resistência ao herbicida imazapir. Carrega 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 (ULIAN ¹ , comunicação pessoal).
SP80-1842	<i>Saccharum</i> sp.	Variedade comercial não portadora de transgenes

2.2.1.2 Linhagens e condições de cultivo

Linhagens endofíticas provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas bem como linhagens de cana-de-açúcar previamente obtidas por Romão et al. (2006), as quais compõem a coleção de fungos endofíticos de cana-de-açúcar do Laboratório de Genética de Microrganismos “Professor Dr. João Lúcio de Azevedo” - Escola Superior de Agricultura “Luiz

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

de Queiroz”, Piracicaba, SP, também foram incluídos na análise (Tabela 2.2). As linhagens CBS318.83 e CBS161.73 de *Epicoccum nigrum* Link foram utilizadas como referência para caracterização morfológica, fisiológica e molecular. Todos os ensaios posteriores foram realizados com culturas monospóricas de cada isolado, as quais foram obtidas através da semeadura (em meio BDA) de diluições apropriadas de uma suspensão de conídios. As linhagens foram mantidas em meio de cultura BDA.

Tabela 2.2 - Isolados de *Epicoccum* avaliados neste estudo

(continua)			
Linhagens	Hospedeiro	Origem	Referência
CBS318.83*	Solo sob <i>Saccharum officinarum</i>	-	-
CBS161.73*	<i>Zea mays</i> , milho doce	-	-
1F4	Folhas de videira (<i>Vitis labrusca</i>)	Jundiá (SP)	Brum (2008)
1F6	Folhas de videira (<i>Vitis labrusca</i>)	Jundiá (SP)	Brum (2008)
1F15	Folhas de videira (<i>Vitis labrusca</i>)	Jundiá (SP)	Brum (2008)
Ep1M	Folhas de macieira	Caxias do Sul (RS)	Camatti-Sartori et al. (2005)
EpAr	Folhas de arroz (<i>Oriza sativa</i>)	Lavras (MG)	-
Ep1sc	Cariopses (semente) de cana-de-açúcar	Piracicaba (SP)	Neste estudo
Ep2sc	Cariopses (semente) de cana-de-açúcar	Piracicaba (SP)	Neste estudo
63Ep	Folhas var. SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Romão et al. (2006)
79Ep	Rizosfera var. SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Romão et al. (2006)
62Ep	Folhas var. SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Romão et al. (2006)
TH21Ep	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TC1	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TH1	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TH2	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TC41	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TC41F	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TC42F	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TH31B	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TC42A	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P24	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P31	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P64	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P42	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P82	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P83	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P112	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P61	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P44	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P62	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P21	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P81	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P74	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TC42B	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TH13A	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TH13B	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TC2	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P22	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P34	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo

Tabela 2.2 - Isolados de *Epicoccum* avaliados neste estudo

(continuação)

Linhagens	Hospedeiro	Origem	Referência
P102	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P103	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P104	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P71	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P75	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P111	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P311	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P32	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P33	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
TH41Ep	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
SP1	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
SP2	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P11	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P12	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P16	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P17	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P98	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C33Ep	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE2	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE3	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE5	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE51	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE6	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE7	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE9	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE10	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE11	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE12	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE13	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE16	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE18	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE22	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE24	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE25	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE27	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE29	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CE39	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CV2	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
CV3	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C12A	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C13A	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C13B	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C41A	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C41B	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C42A	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C42B	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C22B	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P13	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P910	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P58	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P91	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P51	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P55	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo

Tabela 2.2 - Isolados de *Epicoccum* avaliados neste estudo

(conclusão)			
Linhasgens	Hospedeiro	Origem	Referência
P92	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C12B	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C12C	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P93	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P96	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P97	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P99	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P911	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P912	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P121	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P18	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P19	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P52	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P54	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
P57	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo
C41Ep	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Neste estudo

(*) Linhasgens utilizadas como referência; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands.

2.2.1.3 Caracterização molecular de isolados endofíticos de *Epicoccum*

A caracterização molecular dos isolados endofíticos de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros foi realizada por meio de marcadores AFLP e pela análise de restrição das regiões ITS1-5,8S-ITS2 e IGS do DNA ribossômico. Além disso, também foi realizada a análise filogenética com base nas seqüências dos genes ITS e β -tubulina. A análise combinada dos dados de análise de DNA (AFLP e IGS-RFLP) e de seqüências gênicas também foi realizada.

2.2.1.3.1 Extração e manipulação de DNA genômico

Discos de micélio de culturas de 10 dias crescidas em meio BDA (28°C na ausência de luz) foram inoculados em frascos contendo 50 mL de caldo batata (200g de batata cozida, 20g de glicose, 1000 mL de água destilada, pH 6,8). Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente durante 10 dias. Após o cultivo, o micélio foi triturado em nitrogênio líquido e o DNA genômico foi extraído com DNA purification kit (Promega). A quantificação foi feita em gel de agarose 0,8% juntamente com DNA de fago lambda (Invitrogen) com concentração conhecida.

2.2.1.3.2 Amplificação das regiões ITS1-5,8S-ITS2 e IGS do DNA ribossômico e do gene β -tubulina

A região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico foi amplificada com os iniciadores universais ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais amplificam uma região de aproximadamente 600 pb (WHITE et al., 1990). As reações foram preparadas em volume final de 50 μ L, contendo 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de $MgCl_2$; Tampão 1x (50 mM de KCl e 20 mM de Tris-HCl - pH 8,4); 0,05 U. μ L⁻¹ de Taq DNA polimerase (Fermentas); 0,8 μ M de cada iniciador e 20 ng de DNA genômico. As reações controle consistiram na adição de todos os componentes da reação, exceto o DNA genômico. A amplificação foi realizada em termociclador PTC – 200 (MJ Research) programado para desnaturação inicial a 94^oC por 5 min, seguido de 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 30s a 94^oC, 30s a 55^oC e 30s a 72^oC e extensão final de 7 min a 72^oC.

A região espaçadora intergênica foi amplificada com os primers universais CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') e CNS1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3') que amplificam uma região de aproximadamente 2,6 Kb (ANDERSON; STASOVSKI, 1992; WHITE et al., 1990). As reações foram preparadas em volume final de 50 μ L, com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de $MgCl_2$; Tampão 1x (50mM de KCl e 20mM de Tris-HCl - pH 8,4); 0,05 U. μ L⁻¹ de Taq DNA polimerase (Fermentas); 0,2 μ M de cada primer e 20 ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94^oC por 4 min, com 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 1 min a 94^oC, 1 min a 58^oC e 2 min a 72^oC e extensão final de 10 min a 72^oC.

A seqüência parcial do gene β -tubulina foi amplificada com os primers Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'), de acordo com as condições estabelecidas por Glass e Donaldson (1995). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (1,2%), corados com brometo de etídio e fotodocumentados sobre luz UV.

2.2.1.3.3 Purificação de produtos de PCR e seqüenciamento de DNA

Os produtos de amplificação dos genes β -tubulina e ITS foram purificados utilizando UltraClean™ PCR Clean-Up Kit (MOBIO Laboratories). As amostras foram enviadas para seqüenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo, Brasil.

2.2.1.3.4 Análise filogenética baseada nas seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico e do gene β -tubulina

As seqüências de nucleotídeos foram inicialmente analisadas com o auxílio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra a base de dados do GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A análise filogenética foi realizada separadamente para os genes ITS e β -tubulina utilizando data sets completos (138 e 50 taxa, respectivamente) e também de forma combinada, utilizando data sets reduzidos e de igual tamanho (38 taxa). Sequências de 88 linhagens contendo 333 pb da região ITS1-5,8-ITS2 obtidas neste trabalho foram alinhadas utilizando o software MUSCLE (Protein Multiple Sequence Alignment Software) (EDGAR, 2004) e manualmente ajustadas quando necessário, utilizando o programa SEAL (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>), com 50 seqüências de *Epicoccum* depositadas no GenBank.

Os números de acesso e a respectiva origem das seqüências de ITS utilizadas como referência estão sumarizados na Tabela 2.3. A seqüência de ITS de *Phaeosphaeria nodorum* (acesso AF250830) foi utilizada como grupo externo para esta análise. Em relação ao gene β -tubulina, até o momento da realização deste trabalho ainda não havia seqüências de *Epicoccum* depositadas no GenBank. Dessa maneira, 50 seqüências com 269 pb do gene β -tubulina geradas neste estudo foram alinhadas conforme descrito acima utilizando como grupo externo a seqüência de β -tubulina de *P. nodorum* (acesso AY786336).

A análise filogenética foi realizada utilizando os modelos de máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana. A análise de máxima verossimilhança foi realizada com auxílio do software GARLI (ZWICKL, 2006) (disponível em <http://www.bio.utexas.edu/faculty/antisense/garli/Garli.html>) assumindo o modelo GTR (general time-reversible) de substituição de nucleotídeos com valores estimados a partir dos dados. Foram realizadas duas análises independentes, e ambas apresentaram a mesma topologia.

A análise Bayesiana utilizando o método de Cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC) foi realizada com auxílio do software MrBayes (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) assumindo o modelo de substituição de nucleotídeos GTR, com os parâmetros invariante (I) e gama (G). As buscas por MCMC foram realizadas com 10^7 gerações, com amostragem a cada 1000 gerações. Foram realizadas duas buscas independentes para verificação de convergência entre as análises. Após confirmação da convergência entre as duas buscas foram descartadas 1000 árvores iniciais. As 9000 árvores restantes foram analisadas com o programa TreeAnnotator (disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk>). A árvore final apresentada é aquela com máxima credibilidade dos clados, com os valores de probabilidade posterior anotados para cada ramo.

Tabela 2.3 – Origem e substrato / hospedeiro dos acessos de seqüências de ITS1-5,8S-ITS2 utilizadas neste trabalho

(continua)

Acessos	Espécie	Substrato / Hospedeiro	Origem
AF149926	<i>Epicoccum nigrum</i>	Córtex (casca) of <i>Vismia</i> sp.	Colômbia
DQ681348*	<i>E. nigrum</i> (ATCC 96794)	Galhos de <i>Prunus persica</i>	Espanha
AF149927	<i>E. nigrum</i>	<i>Resupinatus applicatus</i> sobre <i>Salix</i> sp.	Espanha
AF149928	<i>E. nigrum</i>	Galhos de <i>Thymus mastichina</i>	Espanha
AF149929	<i>E. nigrum</i>	-	Equador
AF149930	<i>E. nigrum</i>	-	Equador
AF149931	<i>P. epicoccina</i> / <i>E. nigrum</i>	Plântulas de <i>Picea sitchensis</i>	Reino Unido
AF149932	<i>P. epicoccina</i> / <i>E. nigrum</i>	Plântulas de <i>Picea sitchensis</i>	Reino Unido
AF149933	<i>P. epicoccina</i> / <i>E. nigrum</i>	Emulsão de PVA	Reino Unido
AF149934	<i>P. epicoccina</i> / <i>E. nigrum</i>	Unhas dos dedos do pé (humanos)	Holanda
AJ306620	<i>E. andropogonis</i>	<i>Claviceps pusilla</i> sobre <i>Heteropogon contortus</i>	Zimbábue
AJ400905	<i>E. andropogonis</i>	<i>Claviceps purpurea</i> sobre <i>F. arundinacea</i>	República Tcheca
AF455409	<i>E. nigrum</i>	Mucosa nasal de pacientes com sinusite crônica	Áustria
AF455447	<i>E. nigrum</i>	Mucosa nasal de pacientes com sinusite crônica	Áustria
AF455455	<i>E. nigrum</i>	Mucosa nasal de pacientes com sinusite crônica	Áustria
AF455395	<i>E. nigrum</i>	Mucosa nasal de pacientes com sinusite crônica	Áustria
AF455403	<i>E. nigrum</i>	Mucosa nasal de pacientes com sinusite crônica	Áustria
AY842346	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>Humulus lupulus</i>	França
AY842397	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842350	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842374	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842386	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842354	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842404	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842382	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842348	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842372	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842371	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY842357	<i>E. nigrum</i>	Folhas e ramos de <i>H. lupulus</i>	França
AY305363	<i>E. nigrum</i>	<i>H. lupulus</i>	França
AY305359	<i>E. nigrum</i>	<i>H. lupulus</i>	França
AY305360	<i>E. nigrum</i>	<i>H. lupulus</i>	França
AY305362	<i>E. nigrum</i>	<i>H. lupulus</i>	França
AY305364	<i>E. nigrum</i>	<i>H. lupulus</i>	França
AY305361	<i>E. nigrum</i>	<i>H. lupulus</i>	França
AJ279486	<i>Epicoccum</i> sp.	Endofítico de <i>Phragmites australis</i>	Alemanha
AJ279463	<i>Epicoccum</i> sp.	Endofítico de <i>Phragmites australis</i>	Alemanha
AJ279452	<i>Epicoccum</i> sp.	Endofítico de <i>P. australis</i>	Alemanha
AY787697	<i>E. nigrum</i>	Xilema de raiz de <i>Fraxinus excelsior</i>	Lituânia
DQ093668	<i>E. nigrum</i>	Raízes de <i>Pinus sylvestris</i>	Lituânia
AY805558	<i>E. nigrum</i>	Caule de <i>Picea abies</i>	Suécia
AY618231	<i>E. nigrum</i>	Xilema de <i>P. abies</i>	Suécia
FJ228164	<i>E. nigrum</i>	Ramos de <i>F. excelsior</i>	Suécia
FJ424240*	<i>E. nigrum</i> (ATCC 32948)	Combustível de aeronaves	Nova Zelândia
FJ424241*	<i>E. nigrum</i> (ATCC 62191)	Cistos de <i>Heterodera glycines</i>	EUA
AY625064	<i>E. nigrum</i>	Amostras de poeira no interior de residências	EUA

Tabela 2.3 – Origem e substrato / hospedeiro dos acessos de seqüências de ITS1-5,8S-ITS2 utilizadas neste trabalho

			(conclusão)
Acessos	Espécie	Substrato / Hospedeiro	Origem
AY093413	<i>E. nigrum</i>	Cultura de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	EUA
DQ026007	<i>E. nigrum</i>	Sementes de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	México
DQ123608	<i>E. nigrum</i>	Endofítico de <i>Coffea arabica</i>	Brasil
AM901690	<i>E. nigrum</i>	Amostras de poeira no interior de residências	Finlândia

2.2.1.3.5 Estimativa do tempo de divergência entre linhagens endofíticas de *Epicoccum*

O tempo de divergência entre as linhagens, ou seja, o tempo desde o ancestral comum mais recente foi estimado com base nas seqüências dos genes β -tubulina e ITS. Esta análise foi realizada por inferência Bayesiana utilizando o método de Cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC) incluído no programa BEAST version 1.4.1 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). Para tanto, foi utilizado o valor limite inferior da taxa de mutação ($16,7 \times 10^{-9}$ substituições por sítio por ano) proposta por Kasuga et al. (2002) para Eurotiomicetos.

2.2.1.3.6 Análise de isolados endofíticos de *Epicoccum* por meio de marcadores AFLP

A análise de marcadores AFLP foi realizada para acessar a variabilidade genética entre os isolados endofíticos de *Epicoccum* de plantas de cana-de-açúcar e também de outros hospedeiros. A metodologia utilizada seguiu basicamente a descrita por Vos et al. (1995). O DNA genômico (200 ng) foi digerido com as enzimas *Mse*I e *Eco*RI, e os adaptadores específicos (*Eco*RI5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' e 3'-CATCTGACFCATGGTTAA-5' / *Mse*I5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' e 3'-TACTCAGGACTCAT-5') foram ligados aos fragmentos de restrição. Os fragmentos contendo os adaptadores foram pré-amplificados com os iniciadores *Eco*RI (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') + oligo seletivo A ou C. O produto da pré-amplificação foi utilizado como molde para as amplificações seletivas realizadas com o iniciador *Eco*RI mais uma base seletiva (E+A), combinado com iniciadores *Mse*I com duas bases (M+AT ou M+CA). Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida e corados de acordo com a metodologia descrita por Creste et al. (2001). As bandas de AFLP foram registradas manualmente, sendo que somente bandas reproduzíveis foram consideradas para análise. Bandas polimórficas e monomórficas foram determinadas para cada combinação de iniciadores e foram consideradas como sendo independentes, assumindo-se que as de tamanho idêntico possuíam também seqüências idênticas.

2.2.1.3.6.1 Análise dos dados de marcadores AFLP

Numerosos métodos de estudo das relações entre espécies estão disponíveis, cada um apresentando vantagens e limitações. Os métodos mais utilizados são divididos em métodos de agrupamento, métodos de parcimônia e métodos de verossimilhança. Neste trabalho, os dados de AFLP foram analisados utilizando duas destas abordagens: agrupamento e verossimilhança.

A análise fenética dos dados de AFLP foi realizada com o software NTSYS Version 2.1 (Exeter Software Setauket, NY, USA). A matriz de similaridade foi obtida utilizando o coeficiente de Dice com auxílio do programa SIMQUAL, incluído no software. Para comparação, também foi obtida uma matriz utilizando o coeficiente de Jaccard. A correlação entre a árvore gerada e os dados da matriz de distância foi testada por correlação cofenética. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA utilizando o algoritmo SAHN (ROHLF, 2000). Os valores de confiança para os grupos gerados foram determinados com réplicas pela análise de *bootstrap*, utilizando o software WINBOOT (IMMANUEL; NELSON, 1996).

A análise filogenética (refletindo a história evolutiva) dos dados de AFLP foi realizada por inferência Bayesiana conforme descrito recentemente por Koopman et al. (2008). A análise Bayesiana utilizando o método de Cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC) foi realizada com auxílio do software MrBayes (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), utilizando o modelo evolutivo para sítios de restrição (dados binários) implementado no programa. As buscas por MCMC foram realizadas com 10^7 gerações, com amostragem a cada 1000 gerações. Foram realizadas duas buscas independentes para verificação de convergência entre as análises. Após confirmação da convergência entre as duas buscas foram descartadas 1000 árvores iniciais. As 9000 árvores restantes foram analisadas com o programa TreeAnnotator (disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk>). A árvore final apresentada é aquela com máxima credibilidade dos clados, com os valores de probabilidade posterior anotados para cada ramo.

A estrutura genética foi investigada pela análise de variância molecular utilizando o software ARLEQUIN (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000). Os dados haplotípicos foram considerados como sendo derivados de RFLP. O coeficiente F_{st} obtido a partir da análise de variância molecular foi utilizado como uma medida de diferenciação genética entre populações. A significância de F_{st} e os componentes da variância entre populações foram testados com 1023 permutações aleatórias da matriz de distância, usada para gerar uma distribuição nula dos coeficientes de correlação (ARROYO GARCÍA et al., 2002).

2.2.1.3.7 Análise de isolados endofíticos de *Epicoccum* por meio de PCR-RFLP de genes ribossômicos

2.2.1.3.7.1 Análise de restrição da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico

Em reações separadas, nove μL do produto de amplificação das regiões ITS1-5,8S-ITS2 foram digeridos por 16 horas (*overnight*) com diferentes enzimas de restrição seguindo as recomendações do fabricante (Fermentas). A análise de restrição da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico foi realizada pela clivagem com as enzimas *BsuRI*, *HinfI*, *HhaI*, *ApaI*, *PvuII*, *RsaI*, *PstI*, *ClaI*, *Hin6I*, *BglII*, *BamHI*, *SpHI*, *MspI*, *NheI*, *EcoRI*, *NdeI*, *MboI*, *TaqI*, *KpnI* e *DdeI*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 2,4% (m/v), corados com brometo de etídio e fotodocumentados sobre luz UV. Posteriormente, os isolados foram agrupados em haplótipos de acordo com o perfil de restrição. A análise fenética foi realizada conforme descrito para análise de marcadores AFLP.

2.2.1.3.7.2 Análise de restrição da região espaçadora intergênica (IGS) do DNA ribossômico

Para cada reação de clivagem, foram utilizados nove μL das reações de PCR, conforme recomendações do fabricante (Fermentas). As seguintes enzimas foram testadas: *BsuRI*, *XhoI*, *BamHI*, *HincII*, *ClaI*, *NheI*, *EcoRI*, *Hin6I*, *MspI*, *SphI*, *HinfI*, *PvuII*, *RsaI*, *MboI*, *PstI*, *SmaI* e *EcoRV*. Uma matriz de dados binários foi construída e as análises fenética e cladística foram realizadas conforme descrito para os dados de marcadores AFLP.

2.2.1.3.8 Análise filogenética dos dados combinados de *fingerprint* e seqüências de DNA

A análise combinada foi realizada para investigar a congruência dos sinais filogenéticos entre os dados de AFLP, IGS-RFLP, β -tubulina e ITS. Para tanto, os dados não foram concatenados, permitindo, dessa maneira, que cada partição (dado) seguisse o modelo evolutivo apropriado. Para as seqüências de ITS e β -tubulina foi aplicado o modelo de substituição de nucleotídeos GTR, com os parâmetros invariante (I) e gama (G), para acomodar taxas variáveis entre os sítios. Os dados de *fingerprint* de DNA (IGS-RFLP e marcadores AFLP) foram avaliados utilizando o modelo evolutivo para sítios de restrição (dados binários) implementado no programa. A análise filogenética foi realizada por meio de inferência Bayesiana utilizando Cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC), com auxílio do software MrBayes (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), conforme descrito anteriormente para análise de seqüências.

2.2.1.4 Testes de compatibilidade micelial

A ocorrência de interação micelial entre isolados monospóricos foi investigada inoculando-se cada linhagem a uma distância de aproximadamente dois cm uma da outra, em todas as combinações possíveis, em placas de petri contendo meio de cultura BDA. As culturas foram incubadas sob luz natural e à temperatura ambiente (24 – 32°C) por um período máximo de 60 dias. A avaliação se deu por meio de observação macroscópica das reações miceliais, em ambos os lados (frente e reverso) das placas de Petri, no decorrer do período de incubação. Após este período, as placas foram fotografadas e digitalizadas, para análises posteriores.

2.2.1.5 Caracterização cultural e morfológica de isolados endofíticos de *Epicoccum*

Para a caracterização cultural, isolados monospóricos foram cultivados em quatro meios de cultura e avaliados quanto à taxa de crescimento micelial, topografia e coloração das colônias. A caracterização morfológica foi realizada por meio da mensuração das dimensões dos conídios.

2.2.1.5.1 Crescimento micelial em diferentes meios de cultura

As linhagens de *Epicoccum* foram crescidas em meio BDA por 10 dias a 28°C, na ausência de luz. Em seguida, discos de micélio de oito milímetros de diâmetro foram transferidos para placas de Petri descartáveis (diâmetro 90x15 mm) contendo 20 mL dos seguintes meios de cultura: Czapeq (2g NaNO₃, 1g KH₂PO₄, 0,5g MgSO₄.7H₂O, 0,5g KCl, 0,01g FeSO₄.7H₂O, 30g de sacarose e 15g de ágar por litro de água destilada, pH 6,8), Meio de Malte (20g de extrato de malte, 2g de extrato de levedura e 15g de ágar por litro de água destilada, pH 6,8), Meio Completo (PONTECORVO et al., 1953) e meio BDA (200g de batata cozida, 20g de glicose, 15g de ágar por litro de água destilada, pH 6,8).

A mensuração do diâmetro das colônias foi realizada em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de uma régua milimetrada, a cada dois dias. As avaliações encerraram no momento em que um dos isolados atingiu a borda da placa. Com os dados obtidos das mensurações foi possível determinar o índice de crescimento micelial, em centímetros por dia, e a duração da fase lag, em horas. Para tanto, os diâmetros médios (cm) obtidos em cada tempo de medida (dias) foram plotados, e a taxa de crescimento (cm.dia⁻¹) foi obtida a partir da inclinação da reta, por regressão linear, utilizando o software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). Foram inoculadas três placas de Petri para cada linhagem em cada meio de cultura, onde cada placa

constituiu uma repetição, em um delineamento bifatorial. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, onde foi aplicado teste de Tukey para as médias de índice de crescimento micelial e duração da fase lag, ao nível de 5% de significância.

2.2.1.5.2 Caracterização quanto à topografia e coloração das colônias

A topografia das colônias foi avaliada por meio da visualização do comportamento do crescimento micelial, crescimento imerso no meio de cultura ou aéreo; densidade do micélio produzido, crescimento mais (denso) ou menos vigoroso (ralo) e características da borda das colônias (irregular ou uniforme). Foi também avaliada a coloração do micélio aéreo e do fundo da placa das colônias crescidas nos diferentes meios de cultura.

2.2.1.5.3 Caracterização quanto às dimensões dos conídios

As linhagens foram crescidas em meio BDA a 28°C, com fotoperíodo de 16 horas, durante 20 a 30 dias. Em seguida, cinco mL de água destilada esterilizada foram adicionados sobre a superfície das colônias e os conídios foram removidos com o auxílio de uma alça de Drigalski. Para a preparação das lâminas, uma alíquota de 100 µL da suspensão de conídios foi adicionada sobre a superfície da lâmina, coberta com lamínula, e em seguida vedada com esmalte incolor. As lâminas foram armazenadas a 4°C até o momento das análises ao microscópio.

O comprimento e a largura dos conídios foram determinados em um monitor axVision STV-700A acoplado ao microscópio óptico Olympus BH-2 (Japan) e lâmina graduada (Carl Zeiss). Para isso, foram analisados 85 conídios por lâmina, sendo uma lâmina para cada linhagem, num total de 46 linhagens. O método consistiu em projetar a imagem na tela do monitor de vídeo e medir diretamente na tela o comprimento e a largura dos conídios com o auxílio de uma régua. Para calibração do equipamento, inicialmente obteve-se um fator de conversão da unidade cm (medida na tela) para µm (dimensão real dos conídios). Projetando-se a lâmina graduada (Carl Zeiss) no monitor, através do aumento de 40X (lente DPLAN40; 0,65; 160/0.17) do microscópio óptico, e com o auxílio de uma régua, obteve-se por regra de três simples que um cm medido na régua equivale a 22,222 µm. Assim, as medidas de largura ou comprimento dos conídios obtidas em centímetros, multiplicadas por 22,222, resultaram na dimensão dos mesmos em µm.

2.2.1.6 Caracterização fisiológica de isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros

2.2.1.6.1 Secreção de enzimas hidrolíticas em meio sólido

A utilização de meio sólido para detecção de enzimas em fungos, abordagem sugerida por Hankin e Anagnostakis (1975), constituiu o procedimento básico utilizado no presente trabalho. Testes semiquantitativos foram realizados para avaliar a secreção de amilase, lipase, protease, endoglicanase e pectinases pelos isolados de *Epicoccum*. Para tanto, discos de 5 mm de diâmetro de culturas crescidas em BDA a 28°C durante dez dias, foram transferidos para placas de Petri (diâmetro 90x15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura acrescido de diferentes fontes de carbono. A produção de lipase, protease e pectinases (pectina liase e endopoligalacturonase) foi avaliada conforme estabelecido por Hankin e Anagnostakis (1975), onde foram utilizados tween 20, gelatina e pectina cítrica, respectivamente, como fonte de carbono.

A secreção das enzimas amilase e endoglicanase foi avaliada em Meio Mínimo (PONTECORVO et al., 1953) sem a adição de glicose e suplementado com 1% de amido solúvel (Sigma) e 1% de carboximetilcelulose (Sigma) como fonte de carbono, respectivamente. A atividade amilolítica foi detectada após a adição de 10 mL de uma solução de iodo (3g de iodeto de potássio, 1g de cristal de iodo, 100 mL de água destilada) sobre cada colônia. A formação de uma zona amarelada ao redor da colônia e de coloração azul no restante da placa de Petri indicou a hidrólise do amido. A atividade de endoglicanase foi verificada após a adição de cinco mL de uma solução de vermelho congo 0,1% sobre cada colônia e incubação das placas a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a solução de corante foi descartada e as placas foram descoradas com uma solução de NaCl 4M por alguns minutos. A degradação da carboximetilcelulose ao redor da colônia foi caracterizada pela formação de uma área clara e opaca contra uma coloração vermelha para a carboximetilcelulose não degradada (POINTING, 1999).

A produção de exoenzimas foi testada em triplicata e avaliada após quatro dias de crescimento, de acordo com a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975). Inicialmente foram medidos os diâmetros perpendiculares tanto da colônia quanto do halo de degradação e posteriormente o índice enzimático foi calculado por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia. Os dados foram analisados utilizando o programa SAS (Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), onde foi aplicado teste de Tukey para as médias de índice enzimático, ao nível de 5% de significância.

2.2.2 Resultados e discussões

2.2.2.1 Análise filogenética baseada nas seqüências das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico e do gene β -tubulina

As relações genéticas entre isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros foram examinadas utilizando seqüências da região ITS do DNA ribossômico e do gene β -tubulina, por meio de análise de Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana. A amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 com os primers ITS1 e ITS4 produziu um fragmento de aproximadamente 570 pb para 86 isolados estudados bem como para as linhagens referência CBS318.83 e CBS161.73. A análise filogenética com base nesta região foi realizada utilizando 333pb e também incluiu seqüências publicadas de *Epicoccum* obtidas do GenBank.

As duas abordagens utilizadas para análise filogenética separaram as linhagens endofíticas em dois grupos e, um fato que chamou a atenção, foi a separação das linhagens referência, cada uma sendo localizada em um destes grupos, juntamente com a separação das seqüências obtidas do GenBank (Figura 2.2). A formação destes clados foi bem suportada, com valores de bootstrap igual a 100% para os grupos 1 e 2, e probabilidade posterior de 77 % e 55%, respectivamente. Foi possível notar também uma homogeneidade entre as seqüências dentro de cada clado (Figura 2.2). Com esta análise foi possível verificar a perda de correlação entre variação intraespecífica da seqüência de ITS e origem geográfica ou substrato/hospedeiro dos isolados, evidenciando o caráter cosmopolita deste gênero (Tabela 2.3).

A análise de cada região separadamente mostrou que ocorreram variações dentro da seqüência ITS1 e também na seqüência do gene 5,8S. A divergência genética total calculada para a região seqüenciada foi 0,006. Já entre os dois clados, a divergência genética foi 0,015 substituições por sítio. Esta variação está dentro da faixa de variação intraespecífica descrita para outras espécies de fungos e também corresponde aproximadamente aos valores encontrados entre os isolados de *E. nigrum* estudados por Arenal et al. (2000).

Entre as seqüências do GenBank incluídas na análise filogenética, estão quatro seqüências de *Phoma epicoccina* (AF149931, AF149932, AF149933, AF149934), a qual é sinônimo de *E. nigrum* (ARENAL et al., 2000; ARENAL; PLATAS; PELÁEZ, 2004), bem como duas seqüências de *Cerebella andropogonis* (AJ400905, AJ306620), além de outras seqüências publicadas como *E. nigrum* ou *Epicoccum* sp. Interessantemente, todas estas

seqüências foram agrupadas em um mesmo clado (clado 2), juntamente com a linhagem referência CBS161.73 e várias linhagens obtidas neste trabalho (Figura 2.2). O outro clado, com menor número de taxa (clado 1), incluiu a linhagem referência CBS318.83, acessos de *E. nigrum* de banco de linhagens (ATCC 96794, ATCC 32948, ATCC 62191), e as demais linhagens do presente estudo. Como discutido adiante neste trabalho, os dois grupos formados pela análise de ITS apresentaram nítida diferenciação morfo-cultural e fisiológica (seções 2.2.2.6 e 2.2.2.7). Com base nesses dados, as linhagens do clado 1 estudadas neste trabalho correspondem à *E. nigrum*, enquanto que as linhagens do clado 2 formam um grupo com seqüência de ITS semelhante à de *E. andropogonis* e *P. epicoccina/E. nigrum* ou uma nova espécie de *Epicoccum*. Também é possível sugerir que muitas das seqüências depositadas no GenBank como *E. nigrum* tenham sido equivocadamente classificadas, incluindo a linhagem referência CBS161.73 seqüenciada neste trabalho.

Arenal et al. (2000) mostraram por meio de dados de seqüência de ITS que *P. epicoccina* e *E. nigrum* são a mesma espécie biológica. No entanto, estes autores compararam apenas nove isolados, e reforçaram que estes dados devem ser analisados com cautela e que a posição taxonômica de *P. epicoccina/E. nigrum* é imprecisa e não existe adequação para este fungo na sistemática atual desenvolvida para fungos mitospóricos. Pažoutová e Kolínská (2003) compararam seqüências de ITS de diferentes isolados de *Cerebella andropogonis* e verificaram elevada similaridade com os acessos de *P. epicoccina/E. nigrum* estudados por Arenal et al. (2000), e dessa maneira concluíram que *Cerebella* deve ser incluída no gênero *Epicoccum*, o que já havia sido proposto por Schol-Schwarz (1959) em sua revisão do gênero.

Entretanto, os resultados apresentados acima refletiram a necessidade de um estudo mais detalhado sobre a relação genética entre diferentes isolados deste gênero. Como foram utilizados apenas 333 pb da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico, a análise filogenética foi refeita com base em 46 seqüências completas e publicadas da região ITS1-5,8S-ITS2 de *E. nigrum* (Figura 2.3). Esta análise também separou os acessos em dois cladogramas, com valores de probabilidade posterior de 1,0 e 0,63, correspondentes aos cladogramas 1 e 2 da primeira análise. No entanto, o clado contendo a maioria dos acessos (clado 2) foi subdividido em dois subcladogramas, sendo um deles com elevado suporte (probabilidade posterior igual a 0,94), o que sugere a ocorrência de espécies crípticas nestes acessos. Esta investigação, juntamente com a estimativa do tempo de divergência desde o ancestral comum mais recente, revelou que estes grupos estão

divergindo a pelo menos 450.000 mil anos (Figura 2.3). Uma vez que a taxa utilizada para estimativa do tempo de divergência foi a mais conservadora (KASUGA et al., 2002), é possível que este valor tenha sido subestimado, e que o tempo de divergência entre os clados esteja na casa dos milhões de anos (Figura 2.3). Com base nestes resultados, é possível confirmar que estes dois grupos são espécies distintas, mas estreitamente relacionadas, e por isso a variação observada na região ITS seja relativamente pequena. Como discutido por Bruns (2001) e Bruns e Shefferson (2004), muitas vezes a região ITS não difere o suficiente para separar espécies estreitamente relacionadas, e outros genes, por exemplo, genes codificadores de proteína, devem ser analisados, para melhor avaliar a relação genética entre espécies de fungos.

Em função do exposto, o presente trabalho analisou, pela primeira vez, a relação genética entre linhagens de *Epicoccum* com base na seqüência parcial do gene β -tubulina. Utilizando os primers Bt2a e Bt2b, um fragmento de aproximadamente 350 pb foi obtido para 48 isolados endofíticos de *Epicoccum* e também para as linhagens referência CBS318.83 e CBS161.73. A análise de Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana foi realizada utilizando 269 pb e separou as linhagens em dois clados (Figuras 2.4A e 2.4B), semelhante à análise de ITS, porém com menor valor de probabilidade posterior.

No entanto, quando o tempo de divergência entre as linhagens foi estimado, utilizando a taxa de evolução mais conservadora de β -tubulina calculada para Eurotiomicetos (KASUGA et al., 2002), verificou-se que estes grupos estão divergindo a pelo menos 750 mil anos (dados não mostrados), entretanto, como discutido para as seqüências de ITS, este tempo pode ter sido subestimado. Desse modo, embora os suportes estatísticos tenham sido relativamente baixos, a análise filogenética baseada no gene β -tubulina também evidencia a separação das linhagens estudadas em dois taxa distintos.

Uma análise filogenética adicional também foi realizada combinando os dados de seqüências de ITS e β -tubulina. Para esta análise, um número menor de taxa (38) foi utilizado devido ao menor número de seqüências geradas para β -tubulina e ausência de seqüências deste gene nos bancos de dados até o momento da realização deste trabalho. Esta investigação também separou os isolados em dois clados (Figura 2.4C), do mesmo modo que nas análises individuais, com valores de suporte elevados para o clado 1, de *E. nigrum*, sugerindo a separação dos isolados em espécies distintas. Além disso, as seqüências de β -tubulina geradas neste estudo podem futuramente auxiliar a correta identificação de espécies de *Epicoccum*.

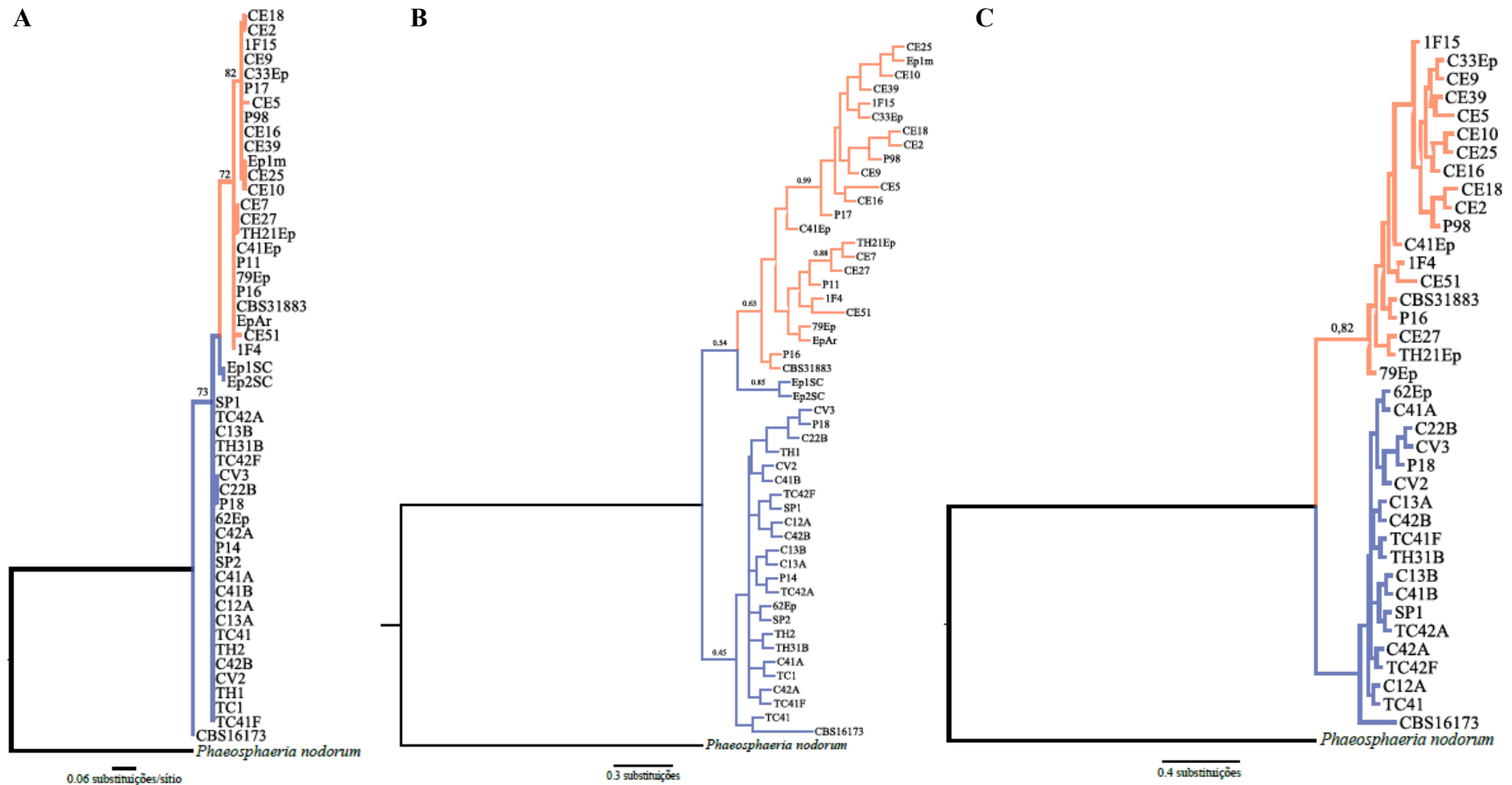


Figura 2.4 – Árvore filogenética gerada por Máxima Verossimilhança (A) e por inferência Bayesiana utilizando MCMC (B) com base na seqüência parcial do gene β -tubulina de linhagens endofíticas de *Epicoccum*. *P. nodorum* (AY786336) foi utilizado como grupo externo para esta análise. Os valores de *bootstrap* (A) e probabilidade posterior (B) estão anotados acima de cada ramo. As barras de escala representam número de substituições por sítio (A) e substituições de nucleotídeos (B). (C) Árvore filogenética com a máxima credibilidade dos clados resultante da análise Bayesiana utilizando MCMC com base na combinação de seqüências de ITS e β -tubulina de linhagens endofíticas de *Epicoccum*. *P. nodorum* (acessos AF250830 e AY786336) foram os acessos utilizados como grupo externo para esta análise. Os valores de probabilidade posterior estão anotados acima de cada ramo. A barra de escala representa substituições de nucleotídeos

2.2.2.2 Análise de isolados endofíticos de *Epicoccum* por meio de marcadores AFLP

A análise de AFLP foi realizada a fim de acessar a variabilidade genética ao nível genômico e as relações entre isolados endofíticos de *Epicoccum* provenientes de cana-de-açúcar e também de outros hospedeiros. No total, 330 bandas foram analisadas, com peso molecular variando de 50 a 500 pb, sendo que todas foram polimórficas. A combinação de primers *EcoRI* + A / *MseI* + CA gerou 161 marcadores enquanto que a combinação *EcoRI* + A / *MseI* + AT produziu 169 marcadores. Considerando os fragmentos obtidos com as duas combinações de primers, a análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Dice ($r = 0,99607$) dividiu os isolados em dois clados principais (clados 1 e 2) (Figura 2.5), correspondendo aos clados previamente obtidos nas análises de seqüências.

A distinção destes dois clados foi suportada por altos valores de *bootstrap* (100 e 91,2%, respectivamente). O clado 1 (de *E. nigrum*) consistiu de isolados com similaridade variando de 0,48 a 1,0, e os isolados do clado 2 apresentaram similaridade de 0,18 a 1,0. Todas as linhagens do clado 1 e 92% das linhagens do clado 2 apresentaram coeficiente de similaridade em torno de 0,48-0,50, revelando a existência de elevada variabilidade entre as linhagens estudadas. O índice de similaridade entre os dois clados foi muito baixo (0,13), sugerindo a existência de dois grupos distintos dentro da população estudada no presente trabalho (Figura 2.5). De 56 linhagens avaliadas, 31 foram pertencentes ao grupo 1 e 25 ao grupo 2. Ainda, dentro de cada um destes dois clados, foi possível distinguir a formação de subgrupos (1A, 1B, 2A, 2B e 2C) com similaridade em torno de 50%, com elevados valores de suporte (Figura 2.5). Para fins de comparação também foi obtida uma matriz de similaridade com base no coeficiente de Jaccard. Esta análise resultou em um fenograma com topologia semelhante ao obtido pelo coeficiente de Dice, com clados bem suportados pela análise de *bootstrap* (dados não mostrados).

Com base na análise fenética dos dados de AFLP, foi possível verificar, de maneira geral, uma ausência de correlação entre origem geográfica / planta hospedeira e similaridade genética dos isolados de *Epicoccum*. O fato de 92,86% das linhagens avaliadas serem provenientes de um mesmo local e hospedeiro (Piracicaba-SP; cana-de-açúcar) e que tais linhagens apareceram distribuídas entre todos os clados do fenograma, sugere que esta espécie apresenta elevada variabilidade, mesmo considerando uma região geográfica restrita. Isso pode ser exemplificado pelas linhagens Ep1sc e Ep2sc (clado 2), as quais foram isoladas de cana-de-açúcar na região de Piracicaba-SP e apresentaram apenas 18% de similaridade com as demais linhagens do

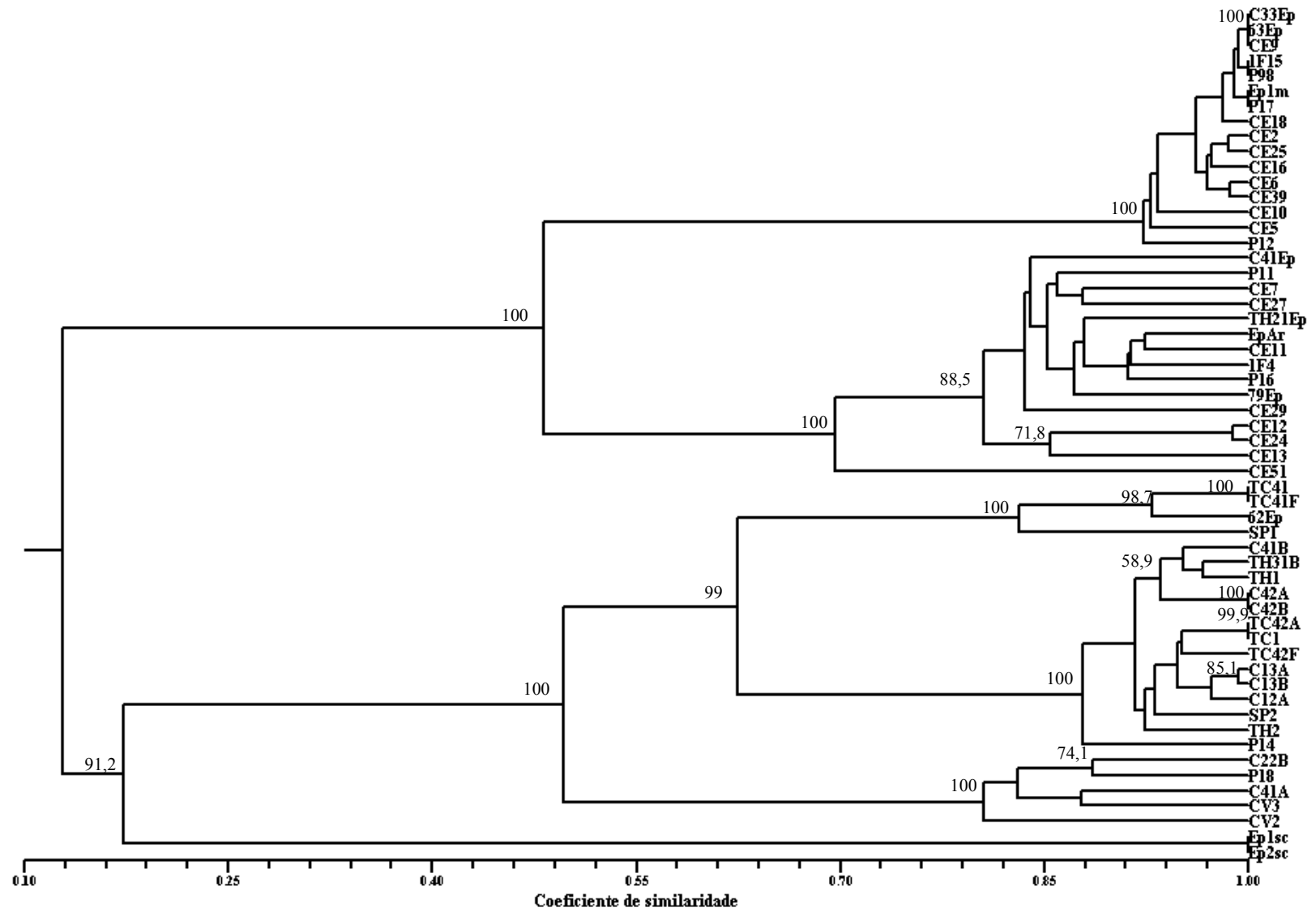


Figura 2.5 - Fenograma (UPGMA) derivado da análise de AFLP de isolados endofíticos de *Epicoccum*. Coeficiente de similaridade de Dice. *Bootstrap* = 1000

respectivo grupo, indicando que diferentes genótipos da espécie podem habitar a mesma planta. Em alguns casos, linhagens isoladas de locais distantes e hospedeiros diferentes foram agrupadas com grau razoável de similaridade. Por exemplo, as linhagens 1F15 e 1F4, provenientes de folhas de videira na região de Jundiaí-SP, a linhagem Ep1m, de folhas de macieira (RS) e a linhagem EpAR, de folhas de arroz (Lavras-MG) apresentaram similaridade de 90% a 100% com linhagens de cana-de-açúcar de Piracicaba-SP.

O nível de diferenciação entre os isolados dos grupos 1 e 2 obtidos na análise de AFLP foi estimado por meio de análise de variância molecular (Tabela 2.4). Esta análise detectou variação significativa ($P > 0,001$) entre os dois grupos de isolados, produzindo um valor de F_{st} de 0,60451, o qual indica um alto nível de diferenciação entre estes clados. Além disso, essa análise revelou que a maior parte da variação detectada (60,45%) corresponde à variação que ocorre entre os grupos, com 39,55% da variação correspondendo a variação existente dentro dos grupos (Tabela 2.4). Com base em estudos prévios sobre a estrutura genética de populações de fungos, valores de F_{st} variando de 0 a 0,2 são considerados níveis baixos a moderados de diferenciação genética entre populações (PIMENTEL; PEEVER; CARRIS, 2000; ARROYO GARCÍA et al., 2002). Desse modo, o baixo nível de similaridade genética entre os dois clados e o alto valor de diferenciação genética encontrado, sugere que estas duas populações estão estruturadas, podendo ser sugerido que estes dois clados são taxa distintos e que não há fluxo gênico entre eles, mesmo ocorrendo em simpatria. Embora menor, a variação observada dentro dos grupos foi relativamente expressiva (~40%) considerando que *Epicoccum* é um fungo mitospórico e que não há teleomorfo conhecido. Na ausência de reprodução sexual, a variabilidade existente dentro dos grupos pode ser originada por vários processos, como mutação, migração ou recombinação parassexual (ARROYO GARCÍA et al., 2002).

Além da análise fenética, os marcadores AFLP foram avaliados por abordagem cladística. A análise Bayesiana gerou uma árvore (Figura 2.6) de topologia congruente com a árvore gerada pela análise fenética (Figura 2.5), especialmente a formação de dois grandes clados, correspondentes aos clados 1 e 2 da análise de agrupamento. Nesta análise, ambos os clados foram bem suportados, com valor de probabilidade posterior igual a 1,0. Também foi possível verificar a formação de subgrupos bem suportados dentro de cada um dos clados, de modo semelhante à análise fenética. Com esta análise foi possível verificar que as linhagens Ep1sc e Ep2sc são geneticamente bastante divergentes em relação às demais linhagens do clado 2. De

Tabela 2.4 – Análise de variância molecular entre os grupos 1 e 2 obtidos a partir da análise de marcadores AFLP de isolados endofíticos de *Epicoccum*

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação	F_{st}
Entre grupos	1	1032,602	36,44546	60,45	0,60451*
Dentro de grupos	54	1287,559	23,84368	39,55	
Total	55	2320,161	60,28914		

(*) $P > 0,001$

maneira geral, as duas abordagens utilizadas para análise dos dados de AFLP dividiram as linhagens estudadas em dois grupos bastante distintos, que representam espécies diferentes, como discutido na análise de seqüências de ITS e β -tubulina.

A utilização de inferência Bayesiana para análise de marcadores AFLP foi recentemente avaliada (KOOPMAN et al., 2008) na reconstrução das relações filogenéticas no gênero *Rosa* (Rosaceae), o qual é considerado um grupo com uma história evolutiva bastante complexa. Estes autores utilizaram métodos de agrupamento, parcimônia e, pela primeira vez, inferência Bayesiana para analisar dados de AFLP e mostraram que esta última abordagem constitui uma alternativa útil à análise de parcimônia. No presente trabalho, esta abordagem foi utilizada pela primeira vez para análise de dados de AFLP de fungos, e os resultados obtidos reforçam a aplicação destes marcadores como fonte de informação filogenética, podendo auxiliar o estudo das relações entre espécies de fungos estreitamente relacionadas.

Um ponto importante observado no presente estudo foi a congruência entre a análise de seqüência da região ITS e a análise de marcadores AFLP. Estes últimos mostraram ser marcadores mais variáveis do que as seqüências de ITS, fornecendo informação filogenética onde as seqüências de ITS foram bastante conservadas, o que pode ser exemplificado pela formação de subclados com elevado suporte dentro de cada um dos clados de AFLP (Figura 2.5) em contraste à homogeneização destes ramos na análise de ITS (Figura 2.2). Estes resultados demonstram a presença de sinal filogenético nos dados de AFLP. Uma comparação preliminar mostrou que os dois clados formados na análise de AFLP com elevado valor de suporte (*bootstrap* e probabilidade posterior) apresentaram diferenças de cinco nucleotídeos na seqüência parcial da região ITS1-5,8S-ITS2. Resultados semelhantes foram observados por Tredway et al. (1999) quando estudaram sete espécies de *Epichlöe*, *Neotyphodium* (o anamorfo de *Epichlöe*), e *Balansia* (Clavicipitaceae) por meio de marcadores AFLP e seqüências de ITS. Estes autores observaram clados com baixos valores de suporte (54%

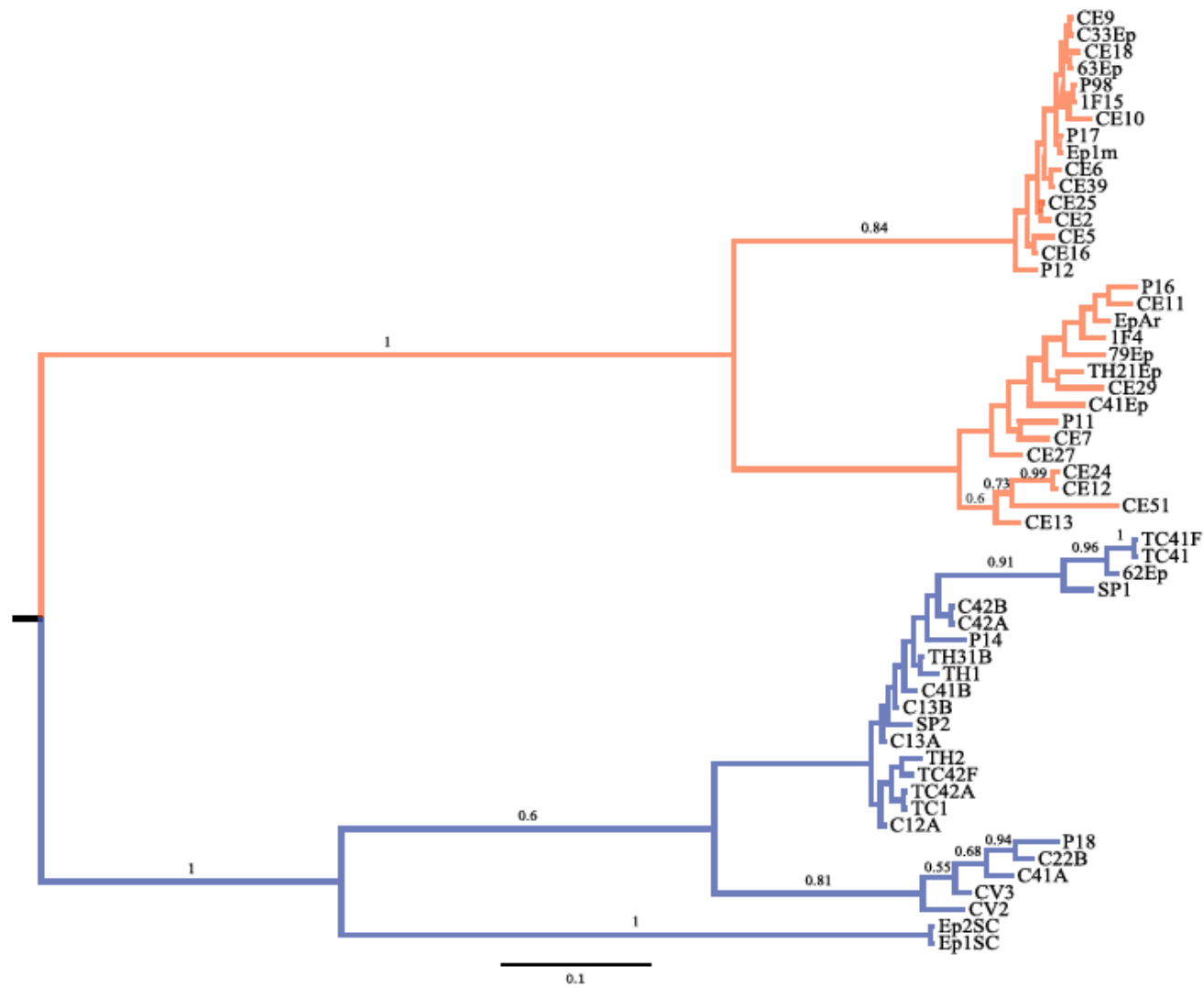


Figura 2.6 – Árvore gerada por reconstrução Bayesiana-MCMC dos dados de AFLP de isolados endofíticos de *Epicoccum*, com máxima credibilidade dos clados. Como não há grupo externo para esta análise, a árvore foi enraizada pelo meio (*midpoint root*). Os valores de probabilidade posterior estão anotados acima de cada ramo

ou menos) para espécies com ITS diferindo de zero a um nucleotídeo ou diferindo em mais do que seis nucleotídeos, e clados com elevado suporte para espécies diferindo em três ou quatro nucleotídeos na região ITS.

Bakkeren, Kronstad e Lévesque (2000) determinaram as seqüências de ITS para 13 espécies de *Ustilago*, *Sporisorium* e *Tilletia* e examinaram oito espécies por meio de marcadores AFLP. Estes autores verificaram que estas oito espécies formaram um único clado na análise de ITS, consistindo de dois subclados contendo diferentes espécies. A análise de AFLP mostrou os mesmos clados que a árvore de ITS, porém a dificuldade na separação das espécies observada na análise de ITS foi resolvida pelos marcadores AFLP. A árvore de AFLP mostrou clados com baixo valor de suporte (62%) para espécies que apresentavam seqüências de ITS idênticas ou seqüências que diferiam sete ou mais nucleotídeos, e clados bem suportados (99% a 100%) para espécies que diferiam de zero a cinco nucleotídeos na região ITS.

Como revisado por Koopman (2005), a congruência existente entre a análise de marcadores AFLP e seqüências de ITS parece ser uma característica geral entre fungos, oomicetos, plantas e bactérias. Estes autores demonstraram, com base em resultados de vários trabalhos de fungos, que os dados de AFLP são filogeneticamente informativos quando a variação correspondente na seqüência de ITS está entre zero e cinco nucleotídeos. Quando o nível de divergência na região ITS está entre zero e dois nucleotídeos, um número maior de marcadores AFLP deve ser analisado a fim de obter informação filogenética suficiente.

Os marcadores AFLP são baseados na análise simultânea de muitos loci representando todo o genoma e, dessa maneira, apresentam potencial para estudos filogenéticos (KOOPMAN, 2005). No entanto, estes marcadores não têm sido amplamente utilizados para inferência filogenética devido à homoplasia existente neste tipo de marcador (CARBONE; ANDERSON; KOHN, 1999; DESPRÉS et al., 2003). No presente estudo, o grande número de marcadores analisados e os altos valores de suporte estatístico obtidos demonstram a presença de sinal filogenético nestes dados, o que também tem sido encontrado para outros fungos como *S. sclerotiorum* (CARBONE; ANDERSON; KOHN, 1999), *F. oxysporum* (BAAYEN et al., 2000) e *V. dahliae* (COLLADO-ROMERO et al., 2008).

De modo geral, os resultados obtidos na presente investigação reforçam a utilidade de marcadores AFLP para diferenciação de espécies de fungos estreitamente relacionadas, como parece ser o caso dos dois clados gerados. Ainda, a análise comparativa destes marcadores com

seqüências de ITS pode solucionar de maneira mais adequada as relações genéticas entre isolados.

De acordo com a literatura avaliada, este é o primeiro relato sobre análise de variabilidade genética de isolados endofíticos de *Epicoccum*. A elevada variabilidade e a ausência de correlação entre origem geográfica ou hospedeiro e similaridade genética verificadas neste trabalho, também foram relatadas por Arenal et al. (1999) quando analisaram uma coleção de 36 isolados de *E. nigrum* de diferentes regiões e substratos por meio de várias técnicas baseadas em fingerprint de DNA. Estes autores descrevem a ocorrência de elevada variabilidade genética nesta espécie e discutem que a principal diferença detectada por cada técnica utilizada é o grau de similaridade entre as linhagens.

O fungo *E. nigrum* é conhecido por ser uma espécie bastante variável. Kilpatrick e Chilvers (1981) coletaram 2000 isolados de uma mesma área e observaram quatro tipos morfológicos distintos. Estes autores encontraram, em um único local, todos os tipos morfológicos descritos por Schol-Schwartz (1959) em sua revisão do gênero. Kilpatrick e Chilvers (1981) também sugeriram que esta heterogeneidade poderia ser explicada se os isolados forem heterocários ou heteroplasmons, e que esta alta variabilidade poderia ser benéfica sob diferentes condições ecológicas.

Na coleção estudada neste trabalho, também foram observados diferentes tipos morfológicos (seção 2.2.2.6), basicamente correspondendo aos tipos descritos por Kilpatrick e Chilvers (1981). No entanto, o grupo descrito como apresentando micélio de coloração variando de púrpura, rosa, cinza e marrom, e ausência de liberação de pigmento laranja/amarelo em meio de cultura BDA (seção 2.2.2.6), foi separado com base nas análises moleculares aqui descritas, formando o clado 2 da análise de AFLP e da análise de seqüências. Estes resultados mostram que a variação inerente a esta espécie foi detectada pela análise molecular e também que a classificação de *E. nigrum* como uma única espécie variável deve ser reavaliada.

Como visto, poucos estudos sobre a variabilidade genética molecular deste gênero foram realizados e a presente investigação contribui para com a caracterização desta espécie de reconhecido potencial biotecnológico. Os resultados da análise de AFLP mostraram a ocorrência de dois taxa com baixa similaridade entre as linhagens investigadas, os quais constituem espécies distintas e estreitamente relacionadas ou crípticas. Além disso, o alto poder de resolução obtido com a técnica de AFLP pode ser utilizado para a discriminação e pré-seleção de linhagens a

serem investigadas quanto à capacidade de produção de metabólitos bioativos, como será mostrado no capítulo 4 desta tese. Ainda, os resultados aqui apresentados reforçam a importância da correta identificação de espécies, especialmente para aplicação em programas de controle biológico e investigação de substâncias de interesse biotecnológico.

2.2.2.3 Aplicação de PCR-RFLP de genes ribossômicos para rápida diferenciação de *Epicoccum* e comparação aos dados de marcadores AFLP

A amplificação específica da região ITS1-5,8-ITS2 do DNA ribossômico produziu um fragmento de aproximadamente 570 pb para 56 isolados e também para as linhagens referência CBS318.83 e CBS161.73. De 20 enzimas de restrição avaliadas, oito clivaram o DNA ribossômico pelo menos uma vez (*HhaI*, *RsaI*, *ClaI*, *Hin6I*, *SpHI*, *MspI*, *EcoRI*, *MboI*). Somente a enzima *MspI* foi capaz de diferenciar as linhagens em dois cladogramas principais (1 e 2), contendo 2 haplótipos (Figura 2.7). As enzimas restantes produziram os mesmos fragmentos de restrição para todos os isolados. Os grupos formados pela análise de restrição do DNA ribossômico apresentaram baixo valor de similaridade (0,40) bem como elevada homogeneidade entre os isolados dentro de cada grupo (Figura 2.8). De modo geral, houve correspondência aos cladogramas obtidos pela análise de AFLP e pela análise de seqüências dos genes ITS e β -tubulina, confirmando a existência de dois taxa distintos entre os isolados estudados.

Arenal et al. (1999) encontraram elevada homogeneidade entre 36 isolados de *E. nigrum* de diferentes regiões geográficas e substratos por meio da técnica de ARDRA. Estes autores relataram a clivagem da região ITS1-5,8-ITS2 do DNA ribossômico pelas enzimas *HhaI* e *MspI* e verificaram a formação de dois subgrupos com similaridade superior a 90%, sugerindo que a variação intraespecífica das seqüências de ITS é muito baixa. Posteriormente isso foi confirmado (ARENAL et al., 2000) por meio de seqüenciamento de DNA, o qual mostrou uma porcentagem de substituição de nucleotídeos nesta região próxima a 1%, dentro da faixa de variação intraespecífica reportada para outras espécies de fungos.

No presente trabalho, a enzima *HhaI* clivou o DNA ribossômico mas não foi capaz de diferenciar os isolados, enquanto que a clivagem com a enzima *MspI* resultou em dois grandes cladogramas com baixo coeficiente de similaridade (40%) (Figura 2.8). Um ponto importante dessa análise foi a separação das linhagens referência de *E. nigrum* (CBS318.83 e CBS161.73), sendo que cada uma foi localizada em um dos dois grupos formados. Este fato reflete a necessidade de

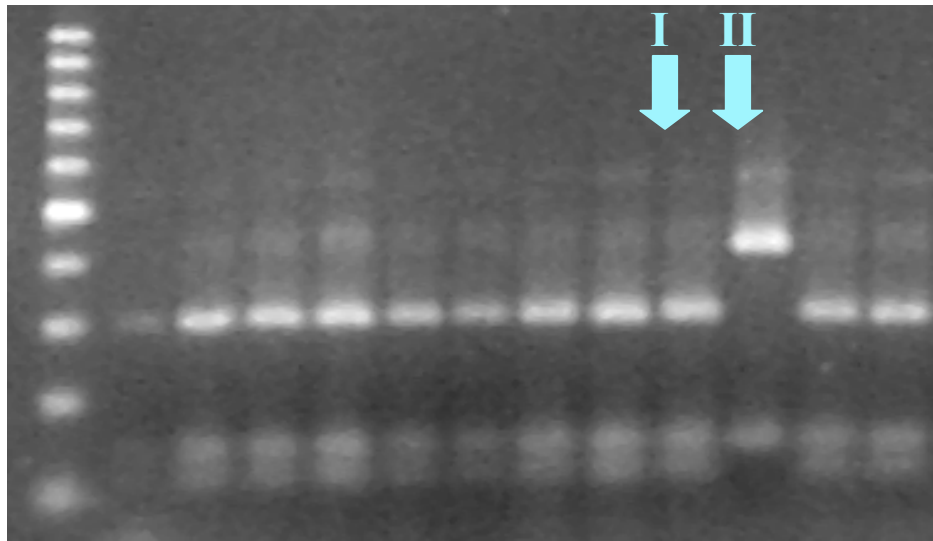


Figura 2.7 - Perfis de restrição da região ITS1-5,8-ITS2 do DNA ribossômico de isolados endofíticos de *Epicoccum*, obtidos com a enzima *MspI*. I – Perfil dos isolados do grupo 1, de *E. nigrum*; II - Perfil dos isolados do grupo 2

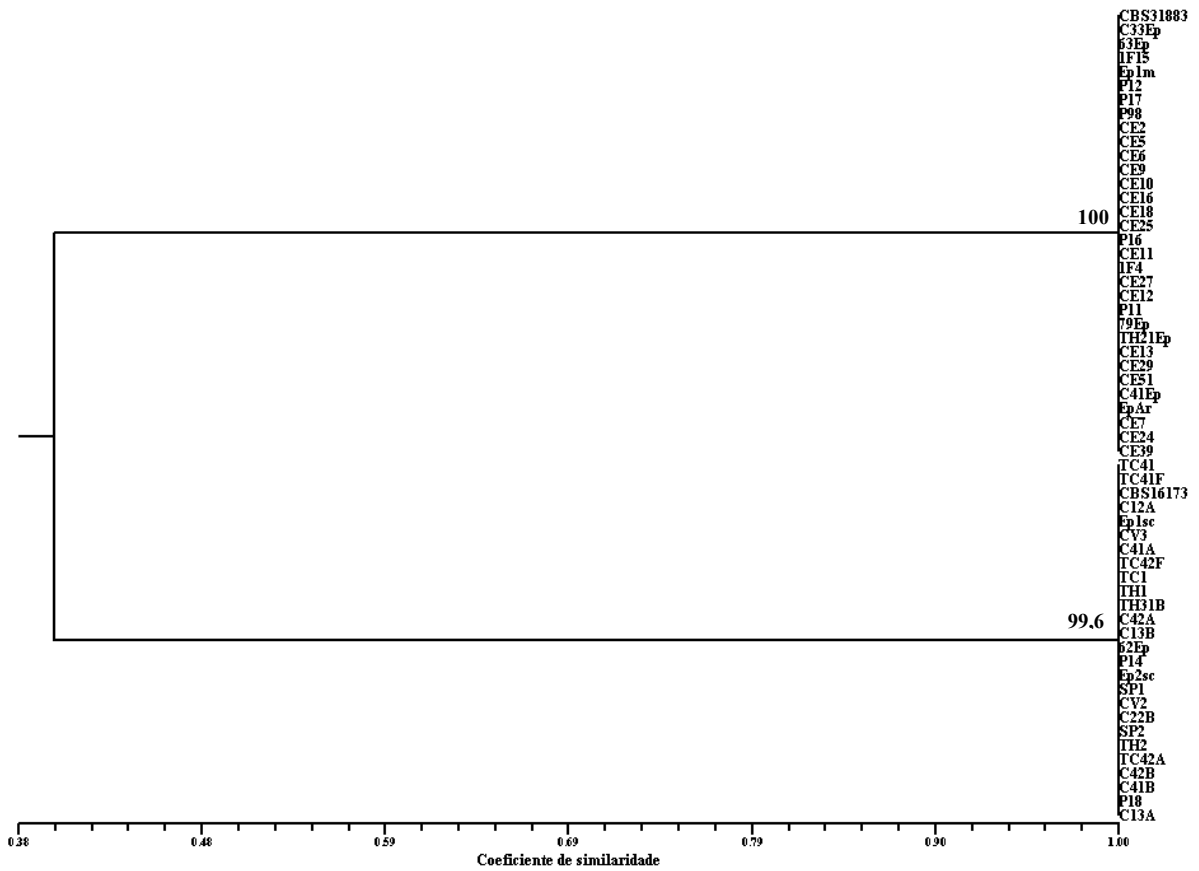


Figura 2.8 - Fenograma (UPGMA) derivado da análise de restrição da região ITS1-5,8-ITS2 do DNA ribossômico de isolados endofíticos de *Epicoccum*, com a enzima de restrição *MspI*; Coeficiente de similaridade de Dice. *Bootstrap* = 1000

revisão das linhagens de *E. nigrum* depositadas em bancos de linhagens microbianas.

Além da análise de restrição da região ITS1-5,8-ITS2 do DNA ribossômico, este trabalho investigou, pela primeira vez, a utilização de IGS-RFLP para diferenciação de isolados de *Epicoccum*. Utilizando os iniciadores CNS1 e CNL12, um único produto de amplificação foi gerado para 54 isolados, com tamanho variando de 2500 a 3000 pb, aproximadamente (Figura 2.9). Uma exceção foi a linhagem CBS161.73, para a qual foram obtidos dois produtos de amplificação, com uma diferença de aproximadamente 150 pb entre cada produto (dados não mostrados). Em função disso, esta linhagem não foi incluída nas análises de restrição da região IGS do DNA ribossômico. De 17 enzimas testadas, cinco (*Bsu*RI, *Hinf*I, *Pst*I, *Msp*I e *Hin*6I) clivaram a região IGS, sendo que três (*Bsu*RI, *Hinf*I e *Pst*I) foram utilizadas para a análise.

O número de perfis diferentes obtidos com cada enzima de restrição variou. A soma dos tamanhos dos fragmentos gerados pelas endonucleases de restrição em geral coincidiu com o tamanho total da região espaçadora intergênica, com pequenas variações provavelmente devidas a fragmentos muito pequenos que não puderam ser resolvidos no gel de agarose. Entretanto, para algumas linhagens, esta soma ultrapassou o tamanho total da região IGS, o que pode indicar a presença de mais de um tipo de seqüência, mas do mesmo tamanho, no genoma destes isolados, como observado para a linhagem referência CBS161.73 que, entretanto, apresentava fragmentos de tamanhos diferentes.

Um aspecto importante derivado desta análise é que cada uma das enzimas de restrição foi capaz de diferenciar as linhagens em dois grupos bastante distintos (Figura 2.10), e sua utilização pode constituir um método simples, rápido e de baixo custo para separar espécies de *Epicoccum*. Com base no padrão de restrição obtido com as três endonucleases, os 54 isolados estudados puderam ser agrupados em 45 haplótipos. Este fato evidencia a ocorrência de alta variabilidade intraespecífica neste fungo, dado que muitos haplótipos foram exclusivos para determinadas linhagens, sendo possível, muitas vezes, discriminar cada isolado (Figura 2.11). Tanto a análise fenética (Figura 2.10) quanto a análise por inferência Bayesiana (dados não mostrados) separaram os isolados de *Epicoccum* em dois clados (1 e 2), com elevados valores de suporte, cada um com 33 e 21 linhagens, e com 25 e 20 haplótipos, respectivamente (Figura 2.10). Nenhum haplótipo foi comum aos dois clados. Especificamente, a análise de IGS-RFLP foi capaz de discriminar as linhagens gerando ramos internos congruentes aos da análise de AFLP (Figura 2.10).

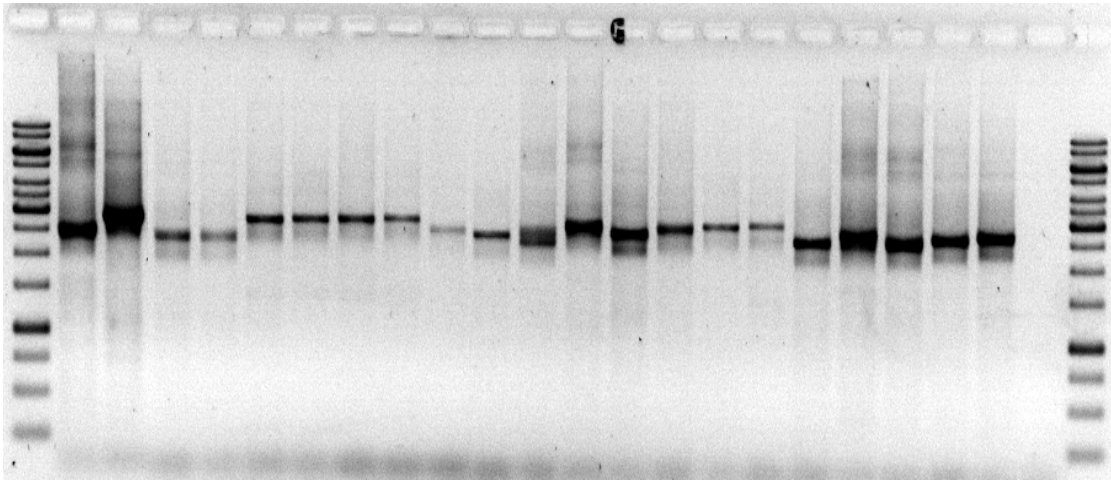


Figura 2.9 – Produto de amplificação da região IGS do DNA ribossômico de isolados endofíticos de *Epicoccum* obtido com os primers CNS1 e CNL12

A variação observada no tamanho das seqüências IGS de *Epicoccum* também foi relatada em outros fungos como *Cochliobolus heterostrophus* (GARBER et al., 1988), *F. oxysporum* (APPEL; GORDON, 1995, 1996), *Pyrenophora graminea* (PECCHIA; MERCATELLI; VANNACCI, 1998), *Verticilium dahliae* (PRAMATEFTAKI; ANTONIOU; TYPAS, 2000) e várias espécies de *Alternaria* (HONG; LIU; PRYOR, 2005). Tais variações foram atribuídas a inserções e deleções no arranjo de sub-repetições dentro da região IGS. Esta região evolui mais rapidamente do que as outras regiões que compõem o DNA ribossômico e é comumente considerada a parte mais variável desta unidade (HILLIS; DIXON, 1991). Em muitos casos onde a estrutura da região IGS tem sido determinada, ela frequentemente apresenta seqüências curtas sub-repetidas e a variação no comprimento desta região é geralmente atribuída à variação no número destas repetições (GANLEY; SCOTT, 1998), um fenômeno que poderia induzir a perda ou adição de sítios de restrição (PECCHIA; MERCATELLI; VANNACCI, 1998).

No presente trabalho, a análise de IGS-RFLP revelou a ocorrência de elevada variabilidade intraespecífica, visto que foram identificados 45 haplótipos em um total de 54 linhagens. Resultados semelhantes foram observados em *F. oxysporum* (APPEL; GORDON 1995), *F. culmorum* (MISHRA; FOX; CULHAM, 2002) e *Dicyma pulvinata* (TAVARES et al., 2004). A região IGS é parte integrante da unidade do DNA ribossômico, a qual é repetida e arranjada em tandem sobre um ou mais cromossomos. A ocorrência de evolução em concerto, por meio de troca desigual de cromátides ou conversão gênica, pode levar a homogeneização das múltiplas cópias da região IGS dentro do indivíduo e a fixação desta região pode ocorrer nas

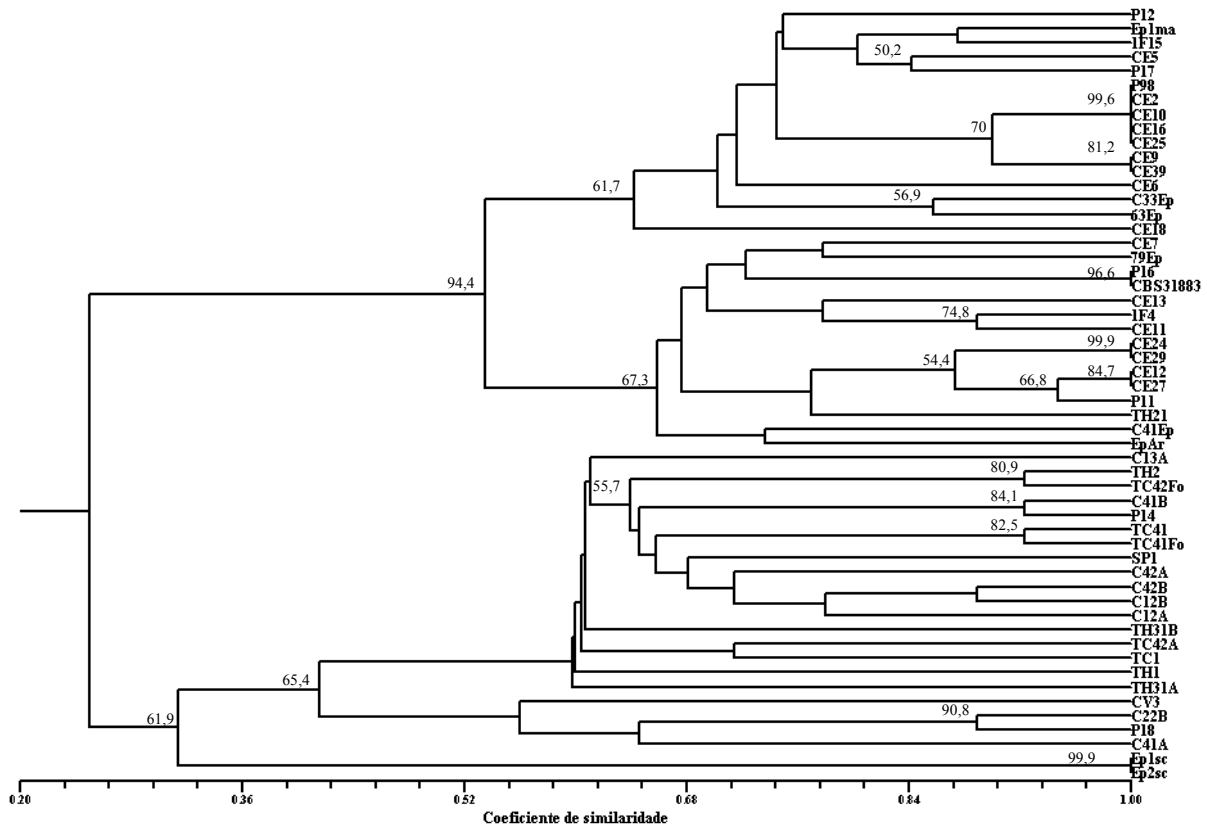


Figura 2.10 - Fenograma (UPGMA) derivado da análise de restrição da região espaçadora intergênica (IGS) do DNA ribossômico de isolados endofíticos de *Epicoccum* com as enzimas de restrição *Bsu*RI, *Pst*I e *Hinf*I; Coeficiente de similaridade de Dice. *Bootstrap* = 1000

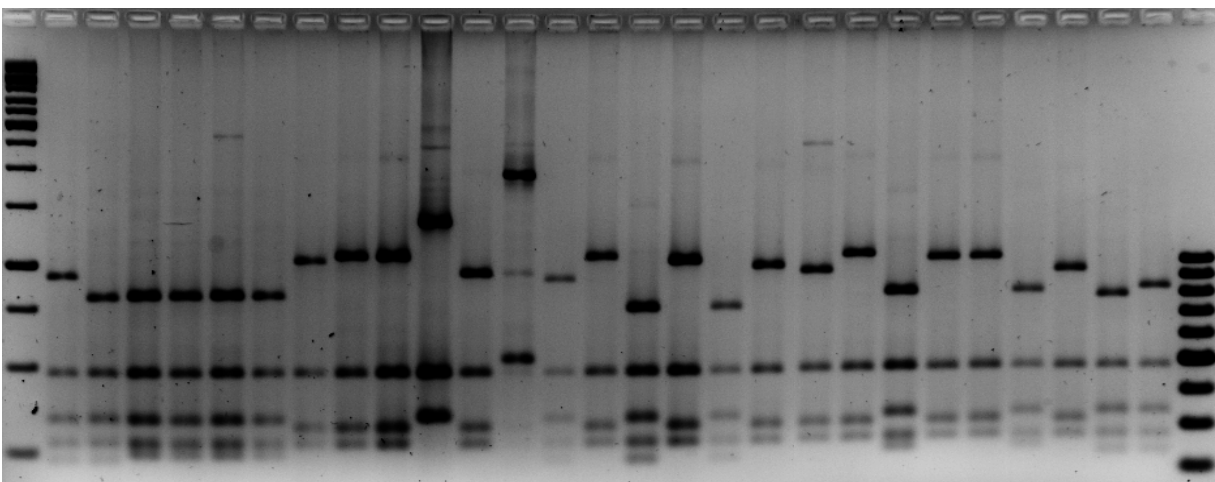


Figura 2.11 – Padrões de RFLP de alguns isolados endofíticos de *Epicoccum* produzidos pela clivagem da região espaçadora intergênica (IGS) do DNA ribossômico com a enzima de restrição *Bsu*RI

populações de espécies que se reproduzem sexuadamente (DOVER, 1982; GANLEY; KOBAYASHI, 2007).

Desse modo, a elevada diversidade de haplótipos observada no presente trabalho pode ser explicada, em parte, pela baixa taxa de evolução em concerto, especialmente ao nível de população, devido à ausência de recombinação sexual (MISHRA; FOX; CULHAM, 2002). *E. nigrum* é um fungo mitospórico e não há um estágio sexual conhecido para esta espécie. Como consequência, muitos variantes estruturais da região IGS ainda são encontrados na população, como pode ser notado pela presença de grande variação no tamanho (Figura 2.9) da região IGS (2500 a 3000 pb) dos isolados avaliados. Estes isolados podem ser considerados intermediários no processo de evolução em concerto, como reportado para outros fungos (GANLEY; SCOTT, 2002).

Os resultados obtidos pela análise de IGS-RFLP sugerem a separação dos isolados de *Epicoccum* em taxa distintos, como já demonstrado pelas análises anteriores. Vários estudos têm demonstrado a utilização de IGS-RFLP para separação de espécies estreitamente relacionadas, como por exemplo, várias espécies de *Fusarium* (KONSTANTINOVA; YLI-MATTILA, 2004), *Alternaria* (HONG; LIU; PRYOR, 2005) e *Gibberella fujikuroi* (HINOJO et al., 2004). Estes estudos relataram, de modo geral, uma congruência entre a separação destas espécies por IGS-RFLP e por outros métodos, como marcadores moleculares, dados de seqüências de DNA e perfil metabólico.

Nesse aspecto, as diferentes técnicas baseadas em *fingerprint* de DNA utilizadas neste trabalho, AFLP, ITS-RFLP e IGS-RFLP, foram capazes de diferenciar os isolados com graus diferentes de similaridade, bem como demonstrar a elevada variabilidade destas linhagens. A técnica de ARDRA apresentou menor potencial de discriminação, enquanto que a análise de marcadores AFLP mostrou maior poder de resolução para diferenciação das linhagens. A análise de IGS-RFLP também foi capaz de distinguir os isolados, e as enzimas de restrição utilizadas nesta investigação podem ser aplicadas para diferenciação rápida de espécies de *Epicoccum*. Além disso, o seqüenciamento de regiões específicas de IGS pode constituir uma ferramenta importante para detecção de linhagens em condições de campo, sendo útil para monitoramento da população de *E. nigrum* em programas de controle biológico.

Estes resultados reforçam a importância de utilizar metodologias que apresentem diferenças quanto ao nível de resolução no estudo de populações de fungos, a fim de obter uma

visão mais realista das relações genéticas entre isolados. Embora apenas duas linhagens referência tenham sido incluídas nas análises, o fato de elas terem sido separadas como espécies distintas, reflete a necessidade de reavaliação taxonômica das linhagens depositadas em bancos de linhagens microbianas.

2.2.2.4 Análise filogenética dos dados combinados de *fingerprint* e seqüências de DNA

O presente trabalho investigou a congruência dos sinais filogenéticos entre os dados de AFLP, IGS-RFLP, β -tubulina e ITS, por meio de inferência Bayesiana. Embora realizada com um número menor de taxa, devido à ausência de *data sets* completos para todas as linhagens estudadas, a árvore gerada pela análise combinada mostrou os mesmos clados que as análises individuais, porém com melhor resolução dos ramos internos de cada um dos dois clados principais (Figura 2.12). A combinação de seqüências e de *fingerprint* de DNA resultou em uma separação mais refinada dos isolados, sendo possível discernir episódios recentes de divergência (formação de subclados) que não foram detectados pela análise de seqüências (Figura 2.12).

O fungo *E. nigrum* é conhecido por ser uma espécie cosmopolita bastante variável. Schol-Schwarz (1959), em sua definição da espécie, observou grandes diferenças na pigmentação, tamanho dos conídios, salientando as variações quanto à forma dos conídios e destacando a verrucosidade, especialmente no ápice destes, e outras características morfológicas, juntamente com freqüente ocorrência de setorização. Em revisão do gênero, esta autora apresentou 57 sinônimos para *E. nigrum* e propôs *E. andropogonis* (Ces.) Schol-Schwarz como uma nova combinação a partir de *Cerebella andropogonis* Ces., sinonimizando *Cerebella* com *Epicoccum*.

Entretanto, Ellis (1971) manteve *Cerebella* e *Epicoccum* como gêneros distintos. Mais recentemente, Pažoutová e Kolínská (1999) citaram a semelhança morfológica destes dois gêneros, mas também não aceitaram *Cerebella* como sinônimo de *Epicoccum*. Estes mesmos autores sugeriram posteriormente o posicionamento de *Cerebella* no gênero *Epicoccum*, por meio de similaridade de seqüência da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico (PAŽOUTOVÁ; KOLÍNSKÁ, 2003). Arenal et al. (2000) analisaram a região ITS do DNA ribossômico e verificaram que *P. epicoccina* e *E. nigrum* são a mesma espécie biológica, e posteriormente propuseram a sinonimização destes gêneros por meio de análise morfológica e molecular (ARENAL; PLATAS; PELÁEZ, 2004). De acordo com Hawksworth et al. (1995), duas espécies são aceitas para o gênero, *E. nigrum* e *E. andropogonis* (Ces.) Schol-Schwarz.

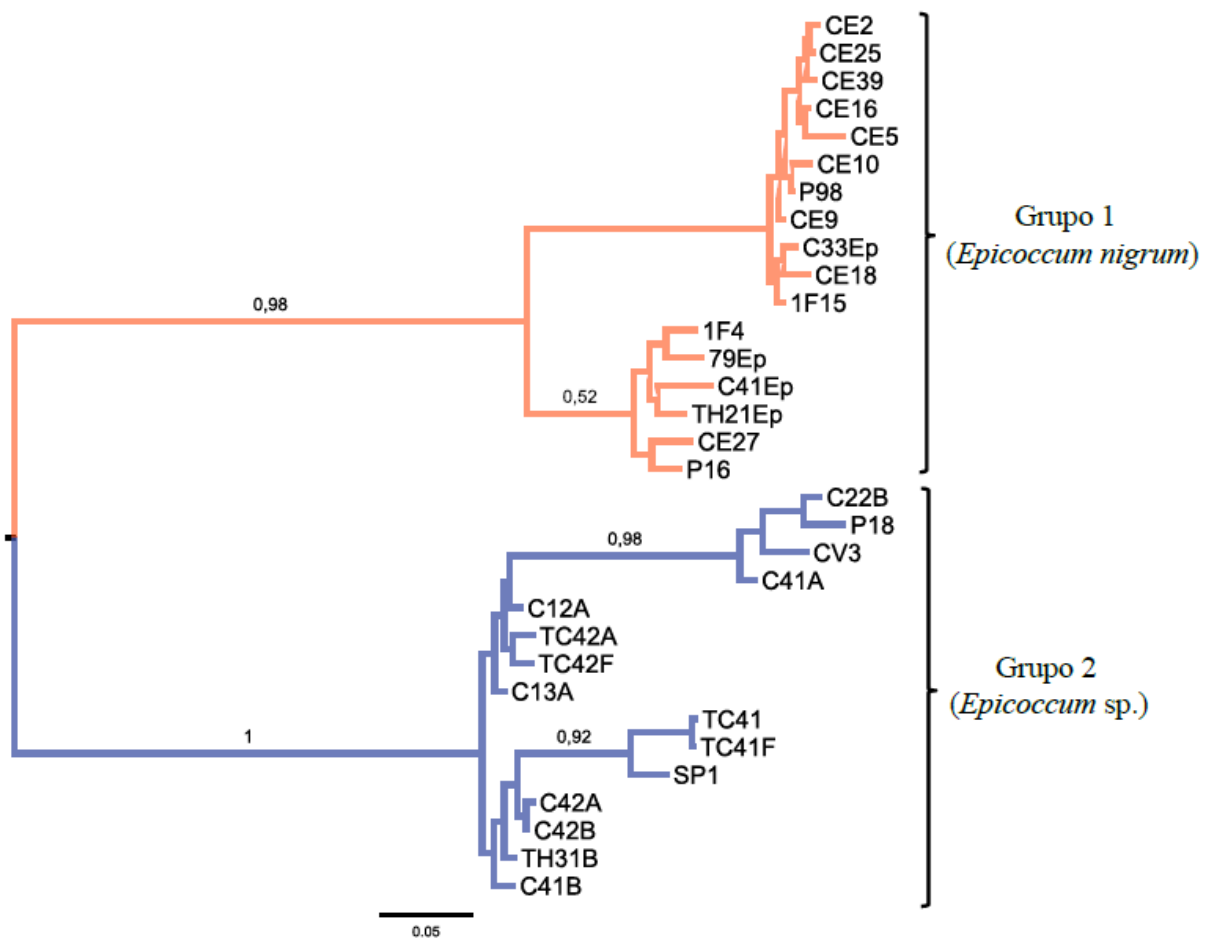


Figura 2.12 – Árvore gerada por reconstrução Bayesiana utilizando Cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC), com base na combinação de dados de *fingerprint* de DNA (AFLP e IGS-RFLP) e de seqüências de DNA (ITS1-5,8S-ITS2 e β -tubulina) de isolados endofíticos de *Epicoccum*. Como não há grupo externo para esta análise, a árvore foi enraizada pelo meio (*midpoint root*). Os valores de probabilidade posterior estão anotados acima de cada ramo

Este trabalho mostrou, por meio de análise molecular, que os isolados estudados podem ser separados em duas espécies distintas. Como descrito anteriormente, quando apenas acessos publicados de seqüências completas de ITS1-5,8S-ITS2 foram analisados, também foi possível verificar a separação em dois clados com elevado suporte estatístico, bem como a formação de subclados, o que pode indicar a ocorrência de espécies crípticas entre estes acessos. Os isolados pertencentes ao clado 2 obtido na presente investigação foram agrupados com seqüências de ITS de *E. andropogonis* e de *P. epicoccina*/*E. nigrum*. Entretanto, a falta de informação morfológica e molecular sobre *E. andropogonis* dificulta a classificação destes isolados como pertencentes a esta espécie. A análise morfocultural, discutida adiante, está de acordo com as descrições de

Schol-Schwartz (1959) e Kilpatrick e Chilvers (1981), no entanto, os diferentes tipos morfológicos foram separados pela análise molecular como sendo espécies distintas.

Muitos exemplos são conhecidos onde diferenças morfológicas têm sido erroneamente interpretadas ou confundidas com variação intraespecífica, e também exemplos onde populações ecologicamente e geograficamente isoladas têm sido classificadas como pertencendo a espécies distintas (MURILLO et al., 2009; CROUS et al., 2004; PRINGLE et al., 2005). O conceito tradicional de espécie para classificação de fungos é baseado na morfologia e biologia reprodutiva, mas abordagens filogenéticas tornaram-se bastante populares recentemente para identificação de espécies (TAYLOR et al., 2000; KOHN, 2005; GEISER et al., 2007).

Além disso, a análise filogenética tem desafiado o conceito de espécie morfológica e tem sido útil para delinear espécies de fungos com poucos caracteres morfológicos distinguíveis (DOUHAN et al., 2008). Esta abordagem também tem sido requisitada para muitos fungos onde a reprodução sexual não ocorre ou não é conhecida, o que dificulta a implementação do conceito de espécie biológica (DOUHAN et al., 2008).

Desse modo, os resultados obtidos neste estudo por meio de abordagem polifásica, a qual incluiu extensa caracterização molecular de um grupo de isolados de *Epicoccum*, juntamente com análises morfocultural e fisiológica, contradizem as interpretações anteriores que classificam *E. nigrum* como uma única espécie variável.

2.2.2.5 Reações miceliais entre isolados endofíticos de *Epicoccum*

Para melhor compreensão das relações genéticas entre as linhagens de *Epicoccum* avaliadas e dos mecanismos de troca de material genético existentes neste fungo, foram realizados testes de compatibilidade vegetativa entre isolados representativos dos dois clados da análise molecular.

A compatibilidade vegetativa refere-se à capacidade de duas linhagens de fungos sofrerem anastomose hifal, a qual resulta na formação de heterocários viáveis. Quando um heterocáριο é estabelecido, os respectivos isolados são localizados no mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (LESLIE, 1993). A compatibilidade vegetativa é, portanto, premissa para a ocorrência de recombinação parassexual em fungos.

Neste estudo, foram realizados pareamentos a fim de avaliar as reações miceliais entre isolados monospóricos de *Epicoccum*. Para nosso conhecimento, este é o primeiro relato da

avaliação de compatibilidade micelial nesta espécie. No total, foram avaliados 1225 pareamentos representando todas as combinações possíveis entre 50 linhagens de *Epicoccum* (25 linhagens pertencentes ao grupo 1, de *E. nigrum*, e 25 linhagens pertencentes ao grupo 2 da análise molecular).

A observação macroscópica dos pareamentos permitiu identificar apenas reações incompatíveis, que resultaram em duas colônias distintas ou em uma descontinuidade na zona de interação entre as duas linhagens. De modo geral, dois tipos de reações de incompatibilidade micelial foram observados: (1) a formação de colônias em íntimo contato na linha de interação entre as linhagens (Figura 2.13); (2) a formação de uma zona de antagonismo caracterizada pela inibição do crescimento micelial das linhagens pareadas (Figuras 2.14 e 2.15). O primeiro tipo de reação micelial foi observado quando linhagens do grupo 1 (de *E. nigrum*) foram pareadas entre si, e quando linhagens do grupo 2 foram pareadas entre si. Quando linhagens dos grupos 1 e 2 foram pareadas entre si, observou-se claramente a ocorrência de uma zona de antagonismo.

Esta análise sugere que a falta de compatibilidade entre as linhagens dos cladós 1 e 2 pode ser resultado de um isolamento reprodutivo, o qual permitiria um aumento na divergência genética entre estes grupos. Em fungos que não apresentam um estágio sexual conhecido, a variação genética observada dentro de populações pode ser originada por vários processos. Por exemplo, em linhagens clonais de fungos, a variação genética causada por mutações é refletida na acumulação de diferenças genéticas entre membros de uma mesma linhagem mitótica (TALBOT et al., 1993). Além de mutação e migração, a atividade de elementos transponíveis pode contribuir para a geração de diversidade em espécies assexuadas (DABOUSSI; CAPY, 2003).

Outro aspecto intrigante sobre a geração de variabilidade em fungos mitospóricos é a ocorrência de genes de *mating type* em espécies sem uma fase sexuada conhecida, por exemplo, *A. alternata* (ARIE et al., 2000), *Cladosporium fulvum* (STERGIOPOULOS et al., 2007) e recentemente *Aspergillus fumigatus* (O’GORMAN; FULLER; DYER, 2009). Tais investigações levantam questões sobre a possibilidade de troca de material genético por recombinação sexual nestas espécies, bem como aspectos evolutivos que levaram a perda de uma fase sexuada.

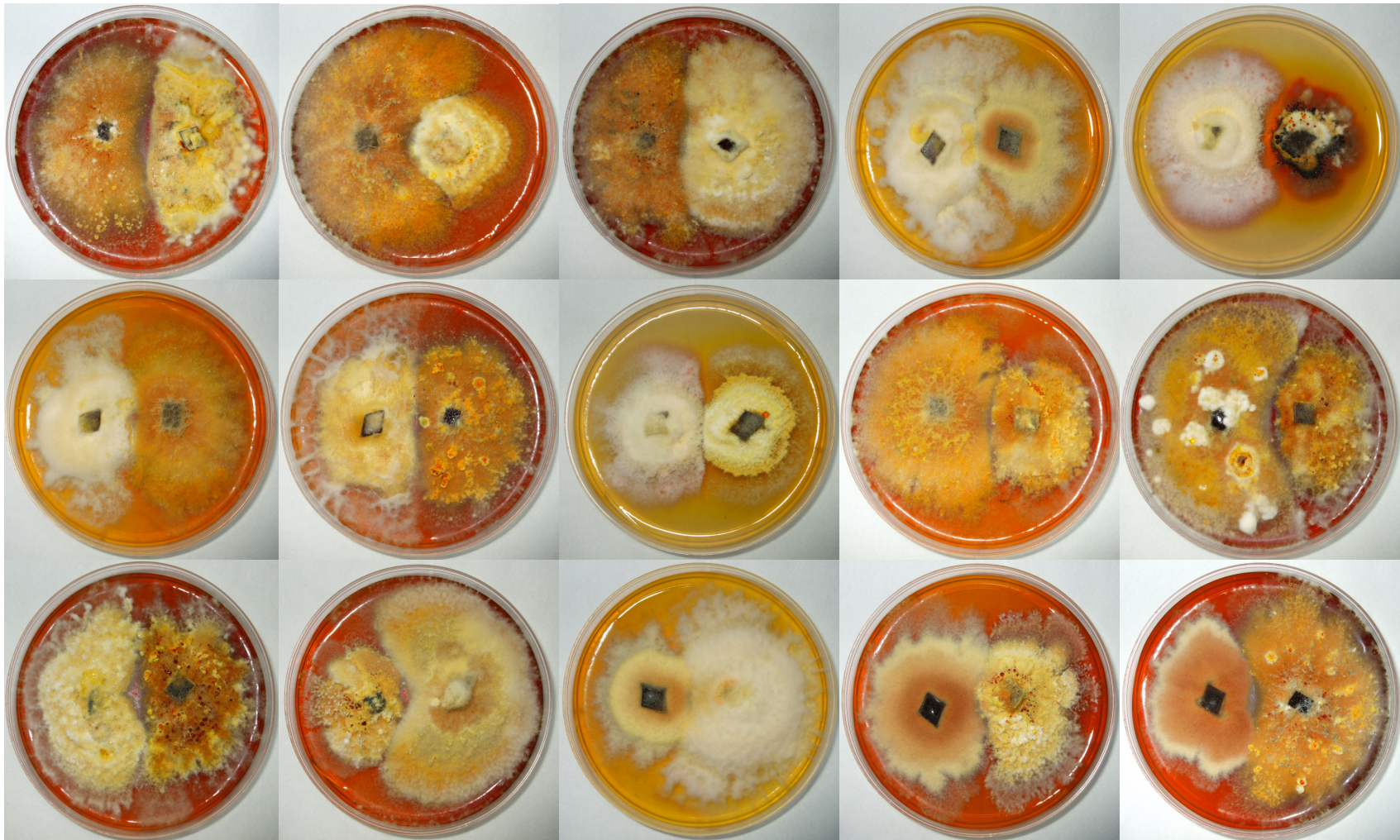


Figura 2.13 – Exemplos de reação micelial incompatível entre isolados endofíticos de *E. nigrum* pertencentes ao grupo 1 da análise de molecular, após 60 dias de crescimento em meio de cultura BDA. Note a formação das colônias em íntimo contato na zona de interação entre as linhagens



Figura 2.14 – Exemplos de reação micelial incompatível entre isolados endofíticos de *Epicoccum* pertencentes aos grupos 1 e 2 da análise molecular, após 60 dias de crescimento em meio de cultura BDA. Note a formação de uma zona de inibição entre as linhagens

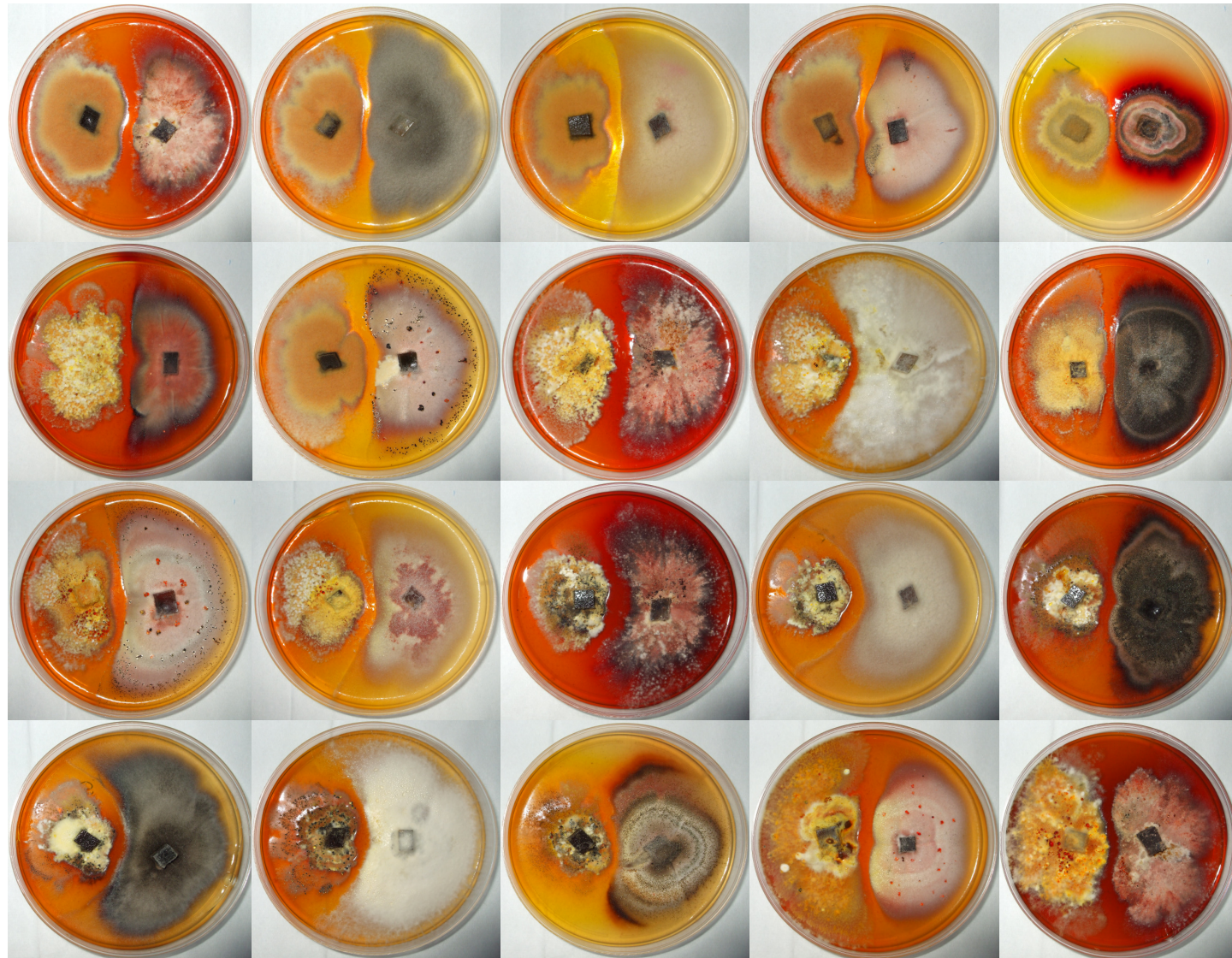


Figura 2.15 – Exemplos de reação micelial incompatível entre isolados endofíticos de *Epicoccum* pertencentes aos grupos 1e 2 da análise molecular, após 60 dias de crescimento em meio de cultura BDA. Note a formação de uma zona de inibição entre as linhagens

2.2.2.6 Caracterização cultural e morfológica de isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros

Os resultados da caracterização cultural estão sumarizados na Tabela 2.6. A análise de variância ($P \leq 0.05$) revelou efeito significativo do meio de cultura sobre o crescimento micelial e duração da fase lag dos 64 isolados avaliados. De maneira geral, embora a duração da fase lag tenha sido significativamente menor em Meio Completo para a maioria das linhagens, o meio BDA proporcionou as maiores taxas de crescimento linear (Tabela 2.5). Estas diferenças podem ser explicadas pela presença de fatores de crescimento nos diferentes meios de cultura testados. Estes fatores podem ser responsáveis por manter o substrato de crescimento em condições nutricionais melhor balanceadas quando comparado à mistura relativamente pobre, fornecida pelo meio Czapeq, no qual todos os constituintes, exceto sacarose e ágar, são minerais. Para muitos fungos, meios de cultura naturais ou semi-sintéticos fornecem determinadas substâncias as quais podem suprir as demandas nutricionais de maneira mais eficiente do que meios de cultura sintéticos (ONOFRE et al., 2001).

A análise de variância mostrou que as linhagens também podem ser diferenciadas quanto à taxa de crescimento micelial e duração da fase lag (Tabela 2.6). Considerando as médias obtidas dos quatro meios de cultura testados, as taxas de crescimento das linhagens do grupo 1 (de *E. nigrum*) foram relativamente menores (0,43 a 1,31 cm.dia⁻¹) do que aquelas do grupo 2 (0,7 a 1,44 cm.dia⁻¹), embora a amplitude de variação do grupo 1 esteja dentro da faixa de variação das linhagens do grupo 2. Em relação à duração da fase lag, foi verificado comportamento inverso, ou seja, as linhagens com taxas de crescimento menores (grupo 1) apresentaram maior período de adaptação às condições do meio de cultura (10,2 a 31,4 horas), enquanto linhagens de crescimento rápido (grupo 2) mostraram menores períodos de duração da fase lag (2,14 a 19,2 horas). Embora a caracterização cultural tenha separado os isolados de *Epicoccum* em dois grandes grupos (Figura 2.16), os quais também foram obtidos pelas análises moleculares, foi possível verificar a ocorrência de subgrupos quanto às taxas de crescimento e duração da fase lag, os quais correspondem aos subclados (1A e 1B) obtidos na análise de AFLP do grupo 1, de *E. nigrum* (ver linhagens na Figura 2.5 e Tabela 2.6).

Com relação à morfologia das colônias (Figura 2.16), as linhagens pertencentes ao grupo 1 apresentaram crescimento micelial aéreo e vigoroso, com margens irregulares e intensa coloração laranja (vista superior) e laranja a vermelho escuro (reverso) em BDA e Meio de

Tabela 2.5 - Efeito do meio de cultura sobre o crescimento micelial e duração da fase lag^(a) de 64 linhagens endofíticas de *Epicoccum*

Meio de cultura	Taxa de crescimento (cm.dia ⁻¹) ^(b)	Fase lag (horas) ^(b)
BDA	1,0282 ^a	14,6210 ^a
Malte	0,9694 ^b	14,8605 ^a
Meio Completo	0,9401 ^b	12,5359 ^b
Czapeq	0,8917 ^c	14,9835 ^a

(a) Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância. (b) Médias baseadas no crescimento de 64 linhagens de *Epicoccum* em cada um dos meios de cultura avaliados.

Malte, coloração que é típica da espécie *E. nigrum* (Tabela 2.6). Essas características também foram observadas em Meio Completo, exceto quanto à coloração (amarelo na parte superior e marrom no reverso das colônias). Em meio Czapeq, a morfologia foi visivelmente alterada, com crescimento micelial ralo e imerso no meio de cultura, margens uniformes e coloração variando de branco-creme e creme-amarelo claro, tanto na parte superior quanto inferior das colônias.

Os isolados do grupo 2 apresentaram crescimento micelial denso e imerso no meio de cultura, colônias com borda uniforme e coloração variando de púrpura, rosa, vermelho, vinho, violeta, cinza e marrom na parte superior e inferior das colônias (Figura 2.16), em meio BDA e Malte. Em Czapeq e Meio Completo verificou-se crescimento ralo e imerso no meio de cultura, com margens uniformes e completa ausência de coloração (micélio branco a creme na parte superior e inferior das colônias) (Tabela 2.6).

Estes tipos morfológicos estão de acordo com as descrições de Schol-Schwartz (1959) e Kilpatrick e Chilvers (1981). No entanto, estes diferentes tipos morfológicos foram separados pela análise molecular como sendo espécies distintas. Os isolados pertencentes ao grupo 1, juntamente com a linhagem referência CBS318.83 apresentaram a coloração alaranjada/amarela típica da espécie *E. nigrum*, enquanto que os isolados do grupo 2, incluindo a linhagem referência CBS161.73 (com ITS semelhante a *E. andropogonis* – *P. epicoccina*/*E. nigrum*) apresentaram coloração variando de púrpura, rosa, vermelho, vinho, violeta, cinza e marrom.

A caracterização morfocultural também revelou que a presença de constituintes de origem vegetal no meio de cultura favorece a produção de pigmentos tanto no micélio quanto no meio de fermentação das linhagens estudadas. O fungo *E. nigrum* é conhecido por produzir vários pigmentos não carotenóides com potencial para a indústria de alimentos (flavipina e orevactaeno) (MAPARI et al., 2005) e carotenóides como β -caroteno, γ -caroteno, rodoxantina e torularodina (GRIBANOVSKI-SASSU; FOPPEN, 1967).

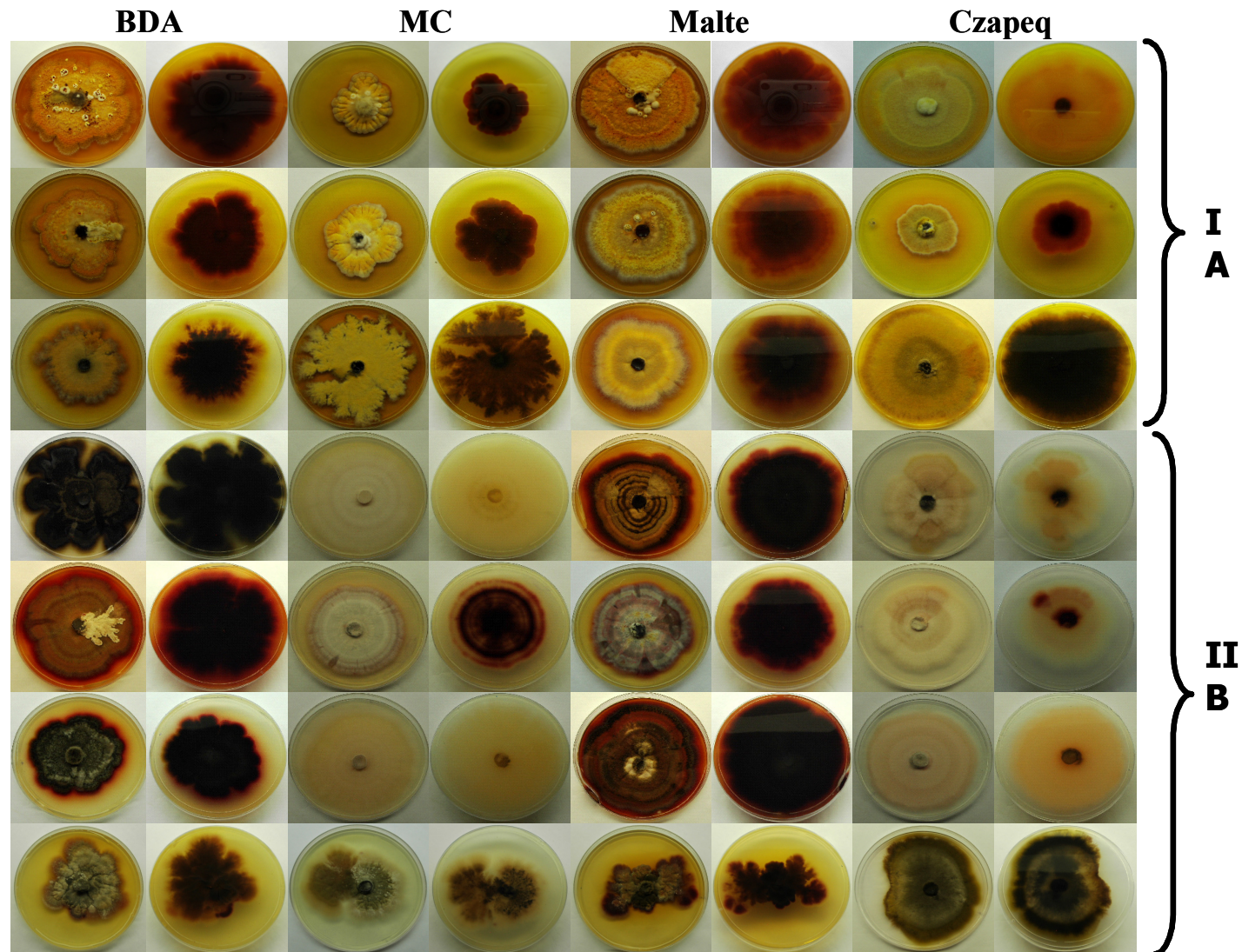


Figura 2.16 – Morfologia de linhagens endofíticas de *Epicoccum* de cana-de-açúcar em diferentes meios de cultura. São representadas três linhagens do grupo 1, de *E. nigrum* (A), e quatro linhagens do grupo 2 da análise molecular (B)

Tabela 2.6 - Caracterização morfofocultural de isolados endofíticos de *Epicoccum* em diferentes meios de cultura

(continua)

Linhagens	Grupo ITS ¹	Grupo AFLP ²	Taxa de crescimento ³ (cm.dia ⁻¹)	Duração da fase lag ³ (horas)	Características do crescimento micelial e coloração das colônias em diferentes meios de cultura ⁵			
					BDA	Malte	Czapeq	Meio Completo
TH31A	2	NT	1,44011 ^a	3,701 ^{ab}	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
62Ep	2	2A	1,42107 ^a	8,367 ^{zwyvuatx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
SP1	2	2A	1,36654 ^{ba}	13,621 ^{nmsqptro}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C12A	2	2A	1,36608 ^{ba}	10,773 ^{wvusqptrx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
CV3	2	2B	1,31131 ^{bac}	4,946 ^{zyabx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
CV2	2	2B	1,28144 ^{bdac}	5,228 ^{zyabx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C41A	2	2B	1,27048 ^{bdac}	7,828 ^{zwyvuatbx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C22B	2	2B	1,26927 ^{ebdac}	5,090 ^{zyabx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
TC42A	2	2A	1,26893 ^{ebdac}	9,367 ^{zwyvusqatrx}	ime., denso, unif.; rosa-ver., rev. rosa-ver.	ime., denso, unif.; rosa-ver., rev. rosa-ver.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C22A	2	NT	1,25548 ^{ebdac}	5,777 ^{zwyabx}	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C13B	2	2A	1,24953 ^{ebacf}	8,945 ^{zwyvusatx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
TH13F	2	NT	1,21869 ^{ebdgef}	5,124 ^{zyabx}	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C13A	2	2A	1,19835 ^{ebdghcf}	7,901 ^{zwyvuatbx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
TC41	2	2A	1,17953 ^{ebdighcf}	8,361 ^{zwyvuatx}	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
P13	2	NT	1,17458 ^{ebdighcf}	7,024 ^{zwyvabx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
TH31B	2	2A	1,15965 ^{ejdighcf}	4,564 ^{zab}	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
TC42F	2	2A	1,13488 ^{eljkdighcf}	9,102 ^{zwyvusatrx}	ime., denso, unif.; rosa-ver., rev. rosa-ver.	ime., denso, unif.; rosa-ver., rev. rosa-ver.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
SP2	2	2A	1,10393 ^{eljkdighmf}	5,791 ^{zwyvabx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
TH2	2	2A	1,07680 ^{eljkighmf}	4,853 ^{zyab}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.

Tabela 2.6 - Caracterização morfofocultural de isolados endofíticos de *Epicoccum* em diferentes meios de cultura

(continuação)

Linhagens	Grupo ITS ⁽¹⁾	Grupo AFLP ⁽²⁾	Taxa de crescimento ⁽³⁾ (cm.dia ⁻¹)	Duração da fase lag ⁽³⁾ (horas)	Características do crescimento micelial e coloração das colônias em diferentes meios de cultura ⁽⁵⁾			
					BDA	Malte	Czapeq	Meio Completo
TH1	2	2A	1,05738 ^{ljknighmf}	3,743 ^{ab}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C41B	2	2A	1,05285 ^{ljknighm}	6,428 ^{zwyvabx}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
TC1	2	2A	1,03655 ^{oljknighm}	7,739 ^{zwyvuabx}	ime., denso, unif.; rosa-ver., rev. rosa-ver.	ime., denso, unif.; rosa-ver., rev. rosa-ver.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
P18	2	2B	1,02042 ^{oljknihmp}	2,333 ^b	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C42A	2	2A	0,98890 ^{oljkniqump}	7,837 ^{zwyvuabx}	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
TC2	2	NT	0,96691 ^{olrknqmp}	6,282 ^{zwyvabx}	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C12C	2	NT	0,84918 ^{ortqsup}	8,924 ^{zwyvusax}	ime., denso, unif.; rosa-ver., rev. rosa-ver.	ime., denso, unif.; rosa-ver., rev. rosa-ver.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
Ep1sc ⁽⁴⁾	2 ⁽⁴⁾	2C	0,83833 ^{rvtqsup}	19,226 ^{gmkiljh}	ime., denso, irreg.; rosa-cl-cinza, rev. cinza-mar.	ime., denso, irreg.; rosa-vinho, rev. rosa-vinho	ime., denso, irreg.; cinza esc., rev. cinza esc.-preto	ime., denso, irreg.; cinza, rev. cinza
CV1	2	NT	0,77858 ^{wrvtxsu}	4,448 ^{ab}	ime., denso, unif.; cinza, rev. cinza esc.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
C12B	2	NT	0,70263 ^{wyvxu}	2,147 ^b	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., denso, unif.; rosa-vinho, rev. vinho-púrp.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.	ime., ralo, unif.; cre., rev. cre.
CBS16173*	2	NT	0,32083 ^c	36,627 ^a	ime., denso, irreg.; rosa-cinza, rev. escuro	ime., denso, irreg.; rosa-cinza, rev. escuro	ime., denso, irreg.; rosa claro, rev. cinza	ime., denso, irreg.; rosa claro, rev. cinza
TH41Ep	1	NT	1,31202 ^{bac}	31,488 ^{ba}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
C33Ep	1	1A	1,19442 ^{ebdghcf}	28,666 ^{bc}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
P17	1	1A	1,14913 ^{ejkdighcf}	27,579 ^{bed}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE39	1	1A	1,10310 ^{eljkdighmf}	26,474 ^{becd}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
63Ep	1	1A	1,05252 ^{ljknighm}	25,260 ^{feed}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE9	1	1A	1,03027 ^{oljknighmp}	24,726 ^{gfeed}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
1F15	1	1A	1,01928 ^{oljknihmp}	24,463 ^{gfeed}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.

Tabela 2.6 - Caracterização morfofocultural de isolados endofíticos de *Epicoccum* em diferentes meios de cultura

(continuação)

Linhagens	Grupo ITS ⁽¹⁾	Grupo AFLP ⁽²⁾	Taxa de crescimento ⁽³⁾ (cm.dia ⁻¹)	Duração da fase lag ⁽³⁾ (horas)	Características do crescimento micelial e coloração das colônias em diferentes meios de cultura ⁽⁵⁾			
					BDA	Malte	Czapeq	Meio Completo
CE16	1	1A	1,00643 ^{oljknqhpmp}	24,154 ^{gfecd}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE5	1	1A	0,97773 ^{oljknqmp}	23,466 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE18	1	1A	0,97619 ^{oljknqmp}	23,429 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE3	1	NT	0,96369 ^{olrknqmp}	23,129 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; ama., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama., rev. mar.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
P12	1	1A	0,96083 ^{olrknqmp}	23,060 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
1F6	1	NT	0,94583 ^{olmqmp}	22,700 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE6	1	1A	0,93024 ^{omqsmmp}	22,326 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
P11	1	1B	0,92643 ^{omqsmmp}	22,234 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE10	1	1A	0,91703 ^{omqsmmp}	22,009 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE2	1	1A	0,87344 ^{omqsup}	20,963 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE22	1	NT	0,85215 ^{ortqsup}	20,452 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE7	1	1B	0,82059 ^{wrvtqsu}	19,694 ^{gfecdh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
1F4	1	1B	0,73964 ^{wyvtxsu}	17,751 ^{nmkiljh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE25	1	1A	0,73297 ^{wyvtxu}	17,591 ^{nmkiljh}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
P98	1	1A	0,71284 ^{wyvxu}	17,108 ^{nmkiljo}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
TH21Ep	1	1B	0,65251 ^{wyvxz}	15,660 ^{nmkpljo}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE11	1	1B	0,63785 ^{wyaxz}	15,308 ^{nmkpljo}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE12	1	1B	0,63034 ^{wyaxz}	15,128 ^{nmkpljo}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
P16	1	1B	0,62167 ^{byaxz}	14,920 ^{nmkplro}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.

Tabela 2.6 - Caracterização morfocultural de isolados endofíticos de *Epicoccum* em diferentes meios de cultura

(conclusão)

Linhagens	Grupo ITS ⁽¹⁾	Grupo AFLP ⁽²⁾	Taxa de crescimento ⁽³⁾ (cm.dia ⁻¹)	Duração da fase lag ⁽³⁾ (horas)	Características do crescimento micelial e coloração das colônias em diferentes meios de cultura ⁽⁵⁾			
					BDA	Malte	Czapeq	Meio Completo
CE24	1	1B	0,60037 ^{byaxz}	14,409 ^{nmsqplro}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE13	1	1B	0,59822 ^{byaxz}	14,357 ^{nmsqplro}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE27	1	1B	0,55643 ^{byaz}	13,354 ^{nmsqplro}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE29	1	1B	0,54989 ^{byaz}	13,197 ^{nusqptro}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
EpAr	1	1B	0,50417 ^{bacz}	12,100 ^{nvusqptro}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CBS31883*	1	NT	0,48369 ^{bacz}	11,609 ^{wvusqptro}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., ralo, unif.; cre.-ama. cl, rev. ama.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
79Ep	1	1B	0,44714 ^{bac}	10,731 ^{wyvusqptrx}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.
CE51	1	1B	0,43418 ^{bc}	10,420 ^{zwyvusqptrx}	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	aéreo, denso, irreg.; lar., rev. lar.-ver.	ime., denso, unif.; ama., rev. lar.-ver.	ime., denso, irreg.; ama., rev. lar.-mar.

(1) Grupos obtidos pela análise filogenética utilizando seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico. (2) Grupos e subgrupos gerados pela análise de marcadores AFLP. (3) Média geral de cada linhagem baseada no crescimento nos quatro meios de cultura avaliados. (4) A linhagem Ep1sc não teve a seqüência de ITS avaliada, mas pertence ao grupo 2 obtido pela análise de ITS-RFLP com a enzima de restrição *MspI*. (5) A caracterização morfocultural é apresentada com palavras abreviadas por questão de espaço na página: ime., crescimento imerso no meio de cultura; unif., colônia com borda uniforme; irreg., colônia com borda irregular; rev., coloração do reverso das placas de Petri; lar., coloração alaranjada; ver., coloração vermelha; púrp., coloração púrpura; mar., coloração marrom; ama., coloração amarela; cre., coloração creme; cl. e esc., claro e escuro (refere-se a intensidade da coloração). (*) Linhagens utilizadas como referência, obtidas do CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands. (NT) Não testado.

Bahrim e Şoptică (2004) avaliaram diferentes substratos quanto à formação de pigmentos amarelos por uma linhagem de *E. nigrum*, altamente produtora e de interesse para a indústria de corantes alimentícios, e verificaram que meios de cultura contendo ingredientes naturais (trigo, farinha de milho) produziram os melhores resultados. Mapari, Meyer e Thrane (2008) observaram aumento significativo na produção de pigmentos amarelos quando *E. nigrum* foi cultivado em substrato sólido de arroz, quando comparado ao cultivo líquido. Nesse contexto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que isolados endofíticos de *Epicoccum* também podem produzir pigmentos de interesse biotecnológico, reforçando a importância de explorar a diversidade de fungos de plantas de clima tropical. Além disso, propõe-se que meios de cultura que possuam constituintes vegetais sejam utilizados com o objetivo de facilitar o isolamento e a identificação desta espécie.

A análise das dimensões dos conídios (Figura 2.17) foi realizada com 15 linhagens do grupo 1 (*E. nigrum*) e com 31 linhagens do grupo 2. Reforçando as diferenças anteriormente verificadas em relação à taxa de crescimento e morfologia das colônias, a análise de variância das dimensões conidiais também revelou diferenças significativas entre os isolados (Tabela 2.7). Os conídios das linhagens do grupo 1, de *E. nigrum*, apresentaram comprimento variando de 25,31 a 38,66 μm e largura de 19,16 a 29,01 μm enquanto que no grupo 2 o comprimento dos conídios variou de 17,67 a 26,69 μm e a largura de 12,81 a 20,13 μm . Embora estes resultados estejam de acordo com a variação descrita na literatura para *E. nigrum* (diâmetro de 15 a 25 μm) (MIMS; RICHARDSON, 2005), os isolados do grupo 1 (*E. nigrum*) apresentaram dimensões superiores.

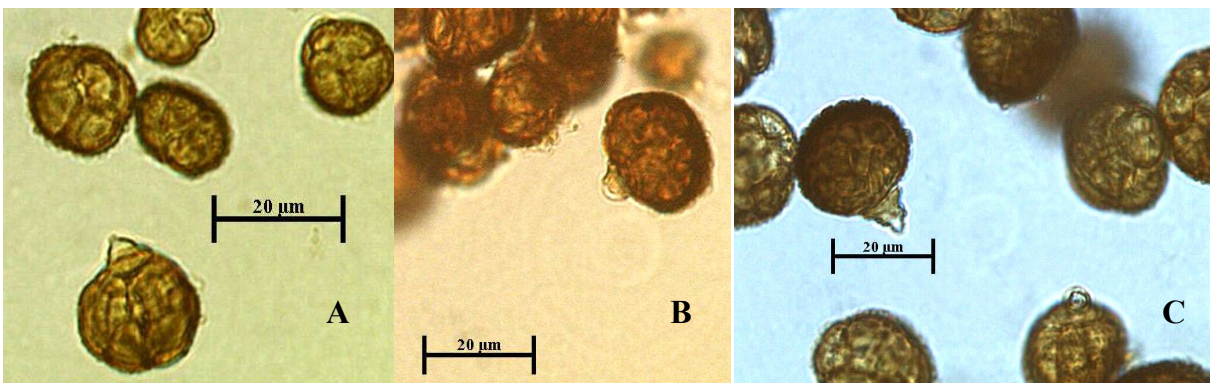


Figura 2.17 - Conídios de *Epicoccum*. A – Linhagem referência de *E. nigrum*, CBS318.83; B – Linhagem P16 (grupo 1); C – linhagem P18 (grupo 2)

Tabela 2.7 – Dimensões de conídios de isolados endofíticos de *Epicoccum* produzidos em meio de cultura BDA

Linhagens	Grupo ITS ⁽¹⁾	Grupo AFLP ⁽²⁾	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Relação C/L
CE5	1	1A	38,5352 ^a	28,2085 ^{ba}	1,37349 ^{ebdac}
CE25	1	1A	38,1953 ^{ba}	28,1823 ^{ba}	1,36211 ^{ebdac}
CE16	1	1A	38,1430 ^{ba}	28,0516 ^{ba}	1,36342 ^{ebdac}
P17	1	1A	37,7509 ^{ba}	27,7117 ^{ba}	1,36811 ^{ebdac}
CE18	1	1A	36,7313 ^{bc}	26,5615 ^{bdc}	1,38610 ^{bdac}
CE9	1	1A	35,3719 ^{dc}	25,9602 ^{edc}	1,36910 ^{ebdac}
1F15	1	1A	34,4307 ^{de}	25,2021 ^{ed}	1,35467 ^{ebdac}
CE29	1	1B	38,6659 ^a	29,0189 ^a	1,34169 ^{ebdac}
CE24	1	1B	37,6986 ^{ba}	27,3458 ^{bac}	1,39271 ^{bdac}
CE11	1	1B	34,8229 ^{de}	24,7054 ^e	1,41485 ^a
CE12	1	1B	34,1431 ^{de}	25,0714 ^{ed}	1,36645 ^{ebdac}
CE13	1	1B	33,2803 ^e	24,3133 ^e	1,37344 ^{ebdac}
CE27	1	1B	30,5874 ^f	22,5356 ^f	1,35898 ^{ebdac}
P16	1	1B	25,5158 ^{hgi}	19,1625 ^{hgi}	1,33723 ^{ebdac}
CE51	1	1B	35,5549 ^{dc}	25,9864 ^{edc}	1,37202 ^{ebdac}
TC41	2	2A	23,7642 ^{ji}	17,9602 ^{kmjli}	1,41098 ^{ba}
C13B	2	2A	26,1693 ^g	19,0842 ^{hjgi}	1,37418 ^{ebdac}
C41B	2	2A	25,3589 ^{hgi}	18,5614 ^{khjgi}	1,37175 ^{ebdac}
SP2	2	2A	22,6401 ^{kjl}	16,7575 ^{pmoln}	1,36341 ^{ebdac}
TH1	2	2A	25,0452 ^{hgi}	19,1104 ^{hjgi}	1,31864 ^{ed}
TH2	2	2A	24,3655 ^{hji}	18,1953 ^{khjli}	1,34712 ^{ebdac}
C22B	2	2B	25,4112 ^{hgi}	19,0057 ^{hjgi}	1,32305 ^{edc}
C41A	2	2B	25,0714 ^{hgi}	18,7181 ^{khjgi}	1,34931 ^{ebdac}
P18	2	2B	24,0780 ^{hji}	18,3260 ^{khjli}	1,30354 ^e
CV2	2	2B	17,6724 ^r	12,8102 ^s	1,38681 ^{bdac}
Ep1SC ⁽³⁾	2 ⁽³⁾	2C	21,9602 ^{kml}	15,8687 ^{poqn}	1,39981 ^{bac}
P24	2	NT	26,6921 ^g	20,1300 ^g	1,33053 ^{ebdc}
P13	2	NT	26,6660 ^g	19,8685 ^{hg}	1,34722 ^{ebdac}
P31	2	NT	25,6465 ^{hg}	19,7640 ^{hg}	1,30118 ^e
P64	2	NT	23,9729 ^{hji}	17,9078 ^{kmjli}	1,34800 ^{ebdac}
P42	2	NT	23,8165 ^{ji}	18,5614 ^{khjgi}	1,29369 ^e
P82	2	NT	23,1367 ^{kj}	17,4634 ^{kmjln}	1,32896 ^{edc}
P910	2	NT	22,6922 ^{kjl}	17,0712 ^{kmoln}	1,33799 ^{ebdac}
P83	2	NT	21,9600 ^{kml}	16,1562 ^{pon}	1,37108 ^{ebdac}
P112	2	NT	21,8294 ^{kml}	16,3392 ^{pmon}	1,34227 ^{ebdac}
P61	2	NT	21,3327 ^{nml}	15,6857 ^{proq}	1,36478 ^{ebdac}
P44	2	NT	20,9406 ^{noml}	15,9471 ^{poqn}	1,31960 ^{edc}
P62	2	NT	20,8098 ^{nomp}	15,3982 ^{proq}	1,35569 ^{ebdac}
P21	2	NT	20,7574 ^{nomp}	15,7380 ^{proq}	1,32143 ^{edc}
P58	2	NT	20,3392 ^{nomp}	15,2152 ^{prq}	1,32460 ^{edc}
P91	2	NT	19,8424 ^{noqp}	15,3720 ^{prq}	1,29601 ^e
P51	2	NT	19,4502 ^{oqp}	14,3786 ^{rqs}	1,36286 ^{ebdac}
P81	2	NT	19,2673 ^{roqp}	14,3264 ^{rqs}	1,35380 ^{ebdac}
P55	2	NT	19,0843 ^{rqp}	14,1172 ^{rs}	1,35794 ^{ebdac}
P74	2	NT	19,0843 ^{rqp}	14,1695 ^{rs}	1,34797 ^{ebdac}
P92	2	NT	18,4306 ^{rq}	14,0911 ^{rs}	1,31535 ^{ed}

(1) Grupos obtidos pela análise filogenética utilizando seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico. (2) Grupos e subgrupos formados pela análise de marcadores AFLP. (3) A linhagem Ep1sc não teve a seqüência de ITS avaliada, mas pertence ao grupo 2 obtido pela análise de ITS-RFLP com a enzima de restrição *Msp*I. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (alfa = 0,05). (NT) Não testado.

2.2.2.7 Abordagem fisiológica: secreção de enzimas hidrolíticas por isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros

A capacidade de produção de zonas de clareamento em meio sólido é um modo simples e rápido de avaliar a secreção de enzimas por fungos (PATERSON; BRIDGE, 1994; St. LEGER; JOSHI; ROBERTS, 1997), sendo por isso o método utilizado no presente trabalho. Este é o primeiro relato da análise de produção de enzimas hidrolíticas por isolados endofíticos de *Epicoccum*. A caracterização fisiológica dos isolados também revelou diferenças significativas entre as linhagens dos grupos 1 e 2. De maneira geral, a análise de variância revelou que os maiores índices enzimáticos foram encontrados entre os isolados do grupo 1, ou seja, de *E. nigrum* (Tabela 2.8). Além disso, este grupo apresentou maior frequência de linhagens produtoras quando comparado ao grupo 2 (Figura 2.18). Diferenças significativas também foram observadas entre as linhagens pertencentes aos diferentes subclados de AFLP (Tabela 2.8).

Alguns isolados não produziram a maioria das enzimas avaliadas (Tabela 2.8). Resultados similares foram encontrados para espécies endofíticas estudadas por Carroll e Petrini (1981) e Lumyong et al. (2002), concluindo que estas linhagens podem ser incapazes de penetrar células vivas ou poderiam penetrar por meio de aberturas naturais, como estômatos, sem ativar o sistema de defesa da planta. Tais endófitos requerem fontes de carbono mais simples para o crescimento, característica nutricional que é comum em fungos simbióticos (CARROLL; PETRINI, 1981).

A produção de proteases não foi verificada para nenhuma das linhagens estudadas. Além disso, a secreção de amilases praticamente não foi detectada entre os isolados do grupo 2 (Tabela 2.8). Estes resultados reforçam as observações de St. Leger et al. (1997) de que os fungos apresentam adaptação enzimática aos requerimentos de seus nichos ecológicos, por exemplo, espécies fitopatogênicas produzem altos níveis de enzimas degradadoras de polissacarídeos pécnicos, celulose e xilana, assim como cutinase, mas secretam baixos níveis de quitinases e protease. Reddy, Lam e Belanger (1996) verificaram a produção de proteases pelo fungo endofítico *Acremonium typhinum* durante a simbiose com *Poa ampla*. Este estudo mostrou que uma serino-proteinase fúngica, *At1*, semelhante à subtilisina de eucariotos, está presente em altos níveis no apoplasto, constituindo de 1 a 2% das proteínas totais da bainha das folhas. Esta proteinase pode ser um importante fator na interação, facilitando a colonização dos espaços intercelulares por degradar proteínas da parede celular ou do apoplasto, liberando produtos que podem servir como uma fonte nutricional para o fungo.

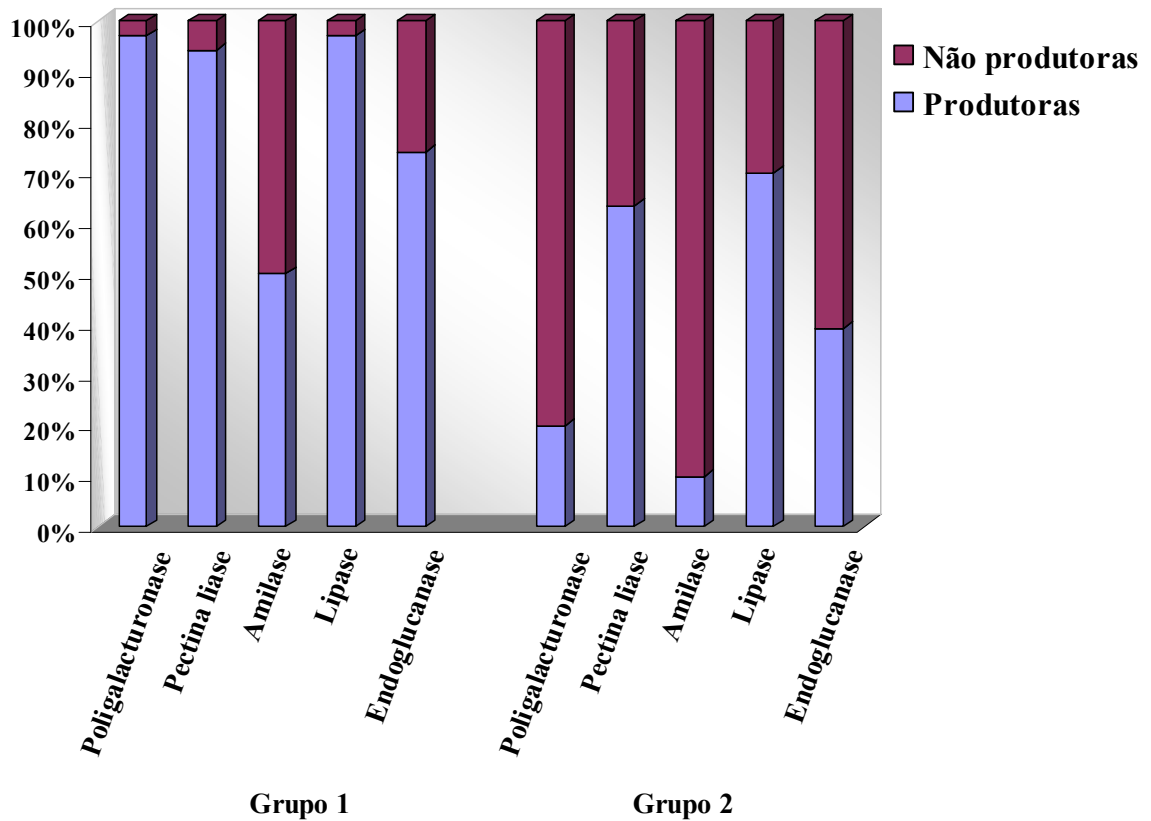


Figura 2.18 – Frequência de linhagens de *Epicoccum* dos grupos 1 e 2 produtoras e não produtoras de halo de degradação enzimática em diferentes substratos

Os isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros também mostraram atividade celulolítica, especialmente os isolados do grupo 1, de *E. nigrum* (Tabela 2.8). Kilpatrick e Chilvers (1981) encontraram elevada variabilidade quanto à produção de celulases (endoglicanases) por diferentes isolados de *E. nigrum*, fato também observado no presente trabalho. Durante a investigação sobre compostos antifúngicos produzidos por *E. nigrum* e sua ação contra os patógenos *Pythium* e *Phytophthora* spp., Brown, Finlay e Ward (1987) verificaram alterações na estrutura da parede celular destes fungos, as quais foram relacionadas à produção de β -1,3-glicanase e celulase por *E. nigrum*. A função de celulases na interação endofítica não é bem compreendida, no entanto Moy et al. (2002) verificaram elevados níveis de uma β -1,6-glicanase fúngica no apoplasto de plantas infectadas, durante a interação entre o fungo *Neotyphodium* sp. e *Poa ampla*, concluindo que esta enzima pode ter uma função nutricional para o fungo, além de estar relacionada aos processos de extensão e ramificação das hifas no interior do apoplasto.

Tabela 2.8 – Produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido por isolados endofíticos de *Epicoccum*

(continua)

Linhagens	Grupo de ITS ⁽¹⁾	Grupo de AFLP ⁽²⁾	Produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido ⁽⁴⁾					
			Poligalacturonase	Pectina liase	Amilase	Lipase	Endoglucanase (Cmcase)	Protease
CBS16173	2	NT	4,22867 ^a	4,8263 ^a	3,24921 ^a	3,4399 ^a	NT	-
CBS31883	1	NT	2,96467 ^b	3,9763 ^b	2,04074 ^b	1,5579 ^{oqnsmptr}	NT	-
CE25	1	1A	2,05033 ^c	1,6623 ^{ioknhmflgj}	1,00000 ^g	2,5333 ^{becd}	1,00000 ^p	-
CE51	1	1B	1,98300 ^{dc}	2,6057 ^d	1,31709 ^{dfce}	2,9464 ^{ba}	1,92593 ^a	-
EpAr	1	1B	1,97667 ^{dce}	2,0497 ^{efg}	1,41173 ^{dc}	2,2552 ^{fhecidg}	1,27111 ^{nmjl}	-
CE24	1	1B	1,84000 ^{gdfee}	2,0897 ^{ef}	1,17045 ^{dfge}	2,7714 ^{bc}	1,55943 ^{dce}	-
CE29	1	1B	1,83267 ^{gdfee}	2,0783 ^{efg}	1,22511 ^{dfge}	1,7273 ^{oqnsmpjklr}	1,00000 ^p	-
CE12	1	1B	1,76867 ^{gdfeeh}	1,6743 ^{iknhmflgj}	1,13545 ^{fge}	2,4852 ^{fbecd}	1,53365 ^{dfce}	-
79Ep	1	1B	1,68233 ^{gdfeih}	1,8117 ^{iehfjg}	1,53333 ^c	2,0427 ^{fhmejkilg}	NT	-
CE13	1	1B	1,66267 ^{gdffjeh}	2,6183 ^d	1,29622 ^{dfce}	2,2241 ^{fhejcidg}	1,80621 ^a	-
TH21Ep	1	1B	1,61700 ^{gkfjeh}	3,3423 ^c	1,21662 ^{dfge}	1,9889 ^{ofnhmejkilg}	1,59758 ^{bc}	-
CE7	1	1B	1,60433 ^{gkfjilh}	1,2717 ^{ronmpq}	1,00000 ^g	1,4576 ^{oqnspr}	1,00000 ^p	-
1F6	1	NT	1,53433 ^{gkmijlh}	1,5200 ^{iknhmolj}	1,16548 ^{dfge}	1,7594 ^{oqnhmpjklr}	1,00000 ^p	-
CE11	1	1B	1,52833 ^{gkmijlh}	2,2580 ^{ed}	1,00000 ^g	1,6718 ^{oqnsmpjklr}	1,30401 ^{gkmjilh}	-
CE27	1	1B	1,52033 ^{gkmnijlh}	1,7387 ^{ikhflgj}	1,11145 ^{fg}	1,8599 ^{oqnhmpjkilg}	1,21625 ^{nmol}	-
P16	1	1B	1,43033 ^{okmnijlh}	1,7417 ^{ikhfgj}	1,00000 ^g	1,8655 ^{oqnhmpjkilg}	1,44127 ^{gdfeieh}	-
P11	1	1B	1,41367 ^{okmnijlh}	1,8660 ^{ehfg}	1,37420 ^{dce}	2,0795 ^{fhjekilg}	1,47004 ^{gdfee}	-
CE22	1	NT	1,35400 ^{okmnijlp}	1,4600 ^{rioknhmplqj}	1,00000 ^g	2,0456 ^{fhmejkilg}	1,39167 ^{gkfjeh}	-
CE10	1	1A	1,32100 ^{okmnijlp}	1,5577 ^{ioknhmplqj}	1,00000 ^g	1,4130 ^{qspr}	1,09369 ^{po}	-
P98	1	1A	1,30467 ^{okmnijlp}	1,6223 ^{ioknhmplqj}	1,36904 ^{dce}	1,5604 ^{oqnsmptr}	1,27366 ^{nmjil}	-
P12	1	1A	1,28800 ^{okmnlp}	1,3250 ^{roknmplq}	1,00000 ^g	2,4859 ^{fbecd}	NT	-
63Ep	1	1A	1,28600 ^{okmnlp}	1,7217 ^{ikhmflgj}	1,00000 ^g	2,4113 ^{fbecdg}	1,00000 ^p	-
CE6	1	1A	1,27300 ^{okmnlp}	1,2020 ^{ropq}	1,00000 ^g	1,5610 ^{oqnsmptr}	1,22881 ^{nmol}	-
1F15	1	1A	1,27167 ^{okmnlp}	1,3927 ^{rioknmplqj}	1,00000 ^g	1,4315 ^{oqspr}	1,19197 ^{nmo}	-
P17	1	1A	1,26767 ^{okmnlp}	1,2627 ^{ronmpq}	1,00000 ^g	2,0846 ^{fhjekilg}	1,11523 ^{npo}	-
CE39	1	1A	1,25600 ^{okmnlp}	1,3303 ^{roknmplq}	1,07811 ^{fg}	1,6338 ^{oqnsmpklr}	1,17956 ^{nmo}	-
1F4	1	1B	1,25033 ^{omnlp}	1,3970 ^{rioknmplqj}	1,00000 ^g	2,0337 ^{fhmejkilg}	1,00000 ^p	-
CE2	1	1A	1,23867 ^{omnp}	1,2037 ^{ropq}	1,10579 ^{fg}	1,5553 ^{oqnsmptr}	1,16254 ^{npmo}	-

Tabela 2.8 – Produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido por isolados endofíticos de *Epicoccum*

(continuação)

Linhagens	Grupo de ITS ⁽¹⁾	Grupo de AFLP ⁽²⁾	Produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido ⁽⁴⁾					
			Poligalacturonase	Pectina liase	Amilase	Lipase	Endoglicanase (CMCase)	Protease
TH41Ep	1	NT	1,22133 ^{omnp}	1,3440 ^{roknmplq}	1,17317 ^{dfge}	1,4859 ^{oqnsmptr}	1,27987 ^{nkmljil}	-
CE9	1	1A	1,19133 ^{omnp}	1,1867 ^{rpq}	1,00000 ^g	1,6751 ^{oqnsmpjklr}	1,27962 ^{nkmljil}	-
CE18	1	1A	1,16067 ^{onp}	1,6577 ^{ioknhmflgj}	1,00000 ^g	2,3017 ^{fhecdg}	1,22820 ^{nkmlol}	-
CE5	1	1A	1,16233 ^{onp}	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,6125 ^{oqnsmplr}	1,00000 ^p	-
C33Ep	1	1A	1,15933 ^{onp}	1,8380 ^{iehfjg}	1,38238 ^{dce}	1,9426 ^{ofnhmpjkilg}	1,58651 ^c	-
CE16	1	1A	1,14600 ^{op}	1,2083 ^{ropq}	1,00000 ^g	1,4079 ^{qsptr}	1,14686 ^{npmo}	-
CE3	1	NT	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,00000 ^p	-
CV1	2	NT	1,93367 ^{dfce}	1,4873 ^{ioknhmplqj}	1,26692 ^{dfce}	2,6768 ^{bcd}	1,75891 ^{ba}	-
Ep1sc ⁽³⁾	2 ⁽³⁾	2C	1,34833 ^{okmniijlp}	1,4233 ^{rioknhmplqj}	1,00000 ^g	2,1967 ^{fhejkidg}	1,00000 ^p	-
C42A	2	2A	1,24733 ^{omnlp}	1,3707 ^{roknmplqj}	1,08078 ^{fg}	2,0209 ^{fnhmejkiig}	NT	-
C22B	2	2B	1,23133 ^{omnp}	1,2557 ^{ronpq}	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,45699 ^{gdfce}	-
P18	2	2B	1,20300 ^{omnp}	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,45055 ^{gdfceh}	-
62Ep	2	2A	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,2738 ^{str}	1,00000 ^p	-
C12B	2	NT	1,00000 ^p	1,2023 ^{ropq}	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,28061 ^{nkmljih}	-
C12C	2	NT	1,00000 ^p	1,2373 ^{ronpq}	1,00000 ^g	1,4321 ^{oqsptr}	1,53162 ^{dfce}	-
C13B	2	2A	1,00000 ^p	1,1217 ^{rq}	1,00000 ^g	1,1590 st	1,00000 ^p	-
CV2	2	2B	1,00000 ^p	1,2213 ^{ronpq}	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,00000 ^p	-
P13	2	NT	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,2610 ^{str}	1,57256 ^{dc}	-
C13A	2	2A	1,00000 ^p	1,0980 ^{rq}	1,00000 ^g	1,1621 st	1,00000 ^p	-
C12A	2	2A	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,4971 ^{oqnsmptr}	1,15238 ^{npmo}	-
C41B	2	2A	1,00000 ^p	1,2443 ^{ronpq}	1,00000 ^g	1,1590 st	1,00000 ^p	-
CV3	2	2B	1,00000 ^p	1,1183 ^{rq}	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,00000 ^p	-
SP1	2	2A	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,5363 ^{oqnsmptr}	1,00000 ^p	-
SP2	2	2A	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,3585 ^{qstr}	1,00000 ^p	-
TC2	2	NT	1,00000 ^p	1,1837 ^{rpq}	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,00000 ^p	-
TC1	2	2A	1,00000 ^p	1,1403 ^{rq}	1,00000 ^g	1,2167 ^{str}	1,00000 ^p	-
TC42F	2	2A	1,00000 ^p	1,1333 ^{rq}	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,18706 ^{nmo}	-
TC41	2	2A	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,5526 ^{oqnsmptr}	1,00000 ^p	-

Tabela 2.8 – Produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido por isolados endofíticos de *Epicoccum*

(conclusão)

Linhagens	Grupo de ITS ⁽¹⁾	Grupo de AFLP ⁽²⁾	Produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido ⁽⁴⁾					
			Poligalacturonase	Pectina liase	Amilase	Lipase	Endoglicanase (CMCase)	Protease
TC42A	2	2A	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,2836 ^{str}	1,41051 ^{gdffjeh}	-
TH1	2	2A	1,00000 ^p	1,2637 ^{ronmpq}	1,00000 ^g	1,1710 st	1,00000 ^p	-
TH13F	2	NT	1,00000 ^p	1,2787 ^{ronmplq}	1,00000 ^g	1,5902 ^{oqnsmplr}	1,39104 ^{gkffjeh}	-
TH2	2	2A	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,2049 ^{str}	1,00000 ^p	-
C22A	2	NT	1,00000 ^p	1,2753 ^{ronmpq}	1,00000 ^g	1,2428 ^{str}	1,00000 ^p	-
TH31A	2	NT	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,4209 ^{oqsptr}	1,00000 ^p	-
TH31B	2	2A	1,00000 ^p	1,2480 ^{ronpq}	1,00000 ^g	1,7182 ^{oqnsmpjkilr}	1,00000 ^p	-
C41A	2	2B	1,00000 ^p	1,0000 ^r	1,00000 ^g	1,0000 ^t	1,37361 ^{gkffjih}	-

(1) Grupos obtidos pela análise filogenética utilizando seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico. (2) Grupos e subgrupos formados pela análise de marcadores AFLP. (3) A linhagem Ep1sc não teve a seqüência de ITS avaliada, mas pertence ao grupo 2 obtido pela análise de ITS-RFLP com a enzima de restrição *MspI*. (4) Índice enzimático obtido pela razão entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia. Valores > 1 indicam secreção de enzimas no meio de cultura resultando em uma zona de degradação ao redor da colônia. Valores =1 indicam zonas de degradação somente abaixo da colônia. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (alfa = 0,05); (NT) Não testado. (-) Não produz halo de degradação.

No presente trabalho foi possível verificar elevados índices enzimáticos (Tabela 2.8) para a produção de lipase, a qual foi produzida por 87,5% das linhagens avaliadas (Figura 2.18). Embora outros estudos sejam necessários para elucidar a natureza endofítica das espécies de *Epicoccum* descritas neste estudo, a elevada produção de lipases pelas linhagens mostra a capacidade destes fungos de usar lipídeos como fonte de energia e que a epiderme da planta hospedeira pode constituir um nicho preferencial para estas espécies.

Entre os isolados avaliados, foram encontradas diferenças significativas principalmente quanto à produção de pectinases (Figura 2.18), sendo possível distinguir os isolados dos grupos 1 e 2 quanto a capacidade de secreção de poligalacturonases (Tabela 2.8). Os resultados apresentados demonstram, de modo geral, que os isolados do grupo 1, de *E. nigrum*, apresentam grande variabilidade quanto à produção de exoenzimas, bem como capacidade saprofítica superior aos isolados do grupo 2, devido à produção da maioria das enzimas hidrolíticas avaliadas (Tabela 2.8). Com esta análise também foi possível perceber que as linhagens que apresentaram taxas de crescimento menores (cm.dia^{-1}) foram capazes de produzir índices enzimáticos mais elevados (ver Tabelas 2.6 e Tabela 2.8).

Além disso, a abordagem fisiológica descrita no presente estudo mostrou-se útil para identificação de marcadores fisiológicos adequados para diferenciação de espécies de *Epicoccum*. A utilização de características fisiológicas que auxiliem a identificação de fungos foi investigada recentemente por Grünig et al. (2008), juntamente com análise de seqüências de DNA, para separação de espécies crípticas dos fungos endofíticos de raiz *Phialocephala fortinii* e *Acephala applanata*. Estes autores verificaram que a produção de diversas exoenzimas não foi capaz de separar as espécies crípticas de *P. fortinii*, no entanto *A. applanata* mostrou-se forte produtora de amilases, lacases e proteinases.

A análise dos padrões de utilização de substrato por fungos endofíticos é importante, pois além de evidenciar o potencial biotecnológico destes fungos, pode auxiliar o entendimento das funções destes microrganismos durante a interação. Estudos demonstram que os endófitos são capazes de metabolizar *in vitro* a maioria dos substratos encontrados nas plantas, sintetizando enzimas para penetração e colonização do hospedeiro, tais como proteases, amilases, fenol oxidases, lipases, lacases, polifenol oxidases, celulases, manases, xilanases e pectina liase (SCHULZ; BOYLE, 2005; LUMYONG et al., 2002). Embora a associação entre plantas e fungos endofíticos seja ecologicamente e agronomicamente importante, pouco é conhecido sobre

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

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

Nesse contexto, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a produção de enzimas hidrolíticas por isolados endofíticos de *Epicoccum* também pode ser importante para a nutrição do fungo durante a interação endofítica com os tecidos de cana-de-açúcar. Se estas enzimas forem produzidas e secretadas na superfície das folhas, podem estar envolvidas na competição por substrato na filosfera. Um aspecto importante observado foi a diferenciação dos grupos 1 e 2 quanto à capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. Esta análise enzimática mostrou que existe preferência por determinados tipos de substrato pelas linhagens das duas espécies, e que diferentes genótipos podem coexistir nos tecidos do hospedeiro. Ainda, a capacidade de utilizar determinados substratos mostra que estas duas espécies não competem pelos mesmos recursos, ou seja, provavelmente ocupam nichos diferenciados na planta hospedeira, reforçando a hipótese de baixo fluxo gênico entre elas. Também é possível dizer que elas ocorrem em simpatria em cana-de-açúcar e provavelmente desempenham funções ecológicas diferentes, visto que muitos dos isolados dos dois grupos foram obtidos a partir dos mesmos fragmentos foliares após desinfecção superficial.

O presente trabalho utilizou uma abordagem polifásica que combinou dados morfológicos, fisiológicos, moleculares e também de compatibilidade vegetativa para estudar as relações entre isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros. A extensa análise molecular foi capaz de distinguir os isolados com diferentes níveis de resolução, bem como revelar a ocorrência de espécies distintas entre as linhagens estudadas. As análises

morfo-cultural e fisiológica também detectaram diferenças significativas entre as linhagens quanto à taxa de crescimento em diferentes meios de cultura, tamanho dos conídios e capacidade de produção de exoenzimas, separando as linhagens de maneira correspondente à análise molecular. Desse modo, esta investigação atenta para o fato de que a classificação de *E. nigrum* como uma única espécie variável deve ser reavaliada.

Referências

- ABDEL-LATEFF, A.; FISCH, K. M.; WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G. M. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 831-834, 2003.
- ANDERSON, J. B.; STASOVSKI, E. Molecular phylogeny of Northern hemisphere species of *Armillaria*. **Mycologia**, New York, v. 84, p. 505–516, 1992.
- ANDRADE, L. H.; KEPPLER, A. F.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 31, p. 129-135, 2004.
- APPEL, D. J.; GORDON, T. R. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 19, p. 120-128, 1995.
- APPEL, D. J.; GORDON, T. R. Relationship among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 9, p. 125-138, 1996.
- ARAÚJO, W. L.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Microbial communities of transgenic sugarcane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOSAFETY OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS, 8, 2004, Montpellier. **Anais...** Montpellier: França, 2004. p. 211-215.
- ARENAL, F.; PLATAS, G.; MARTÍN, J.; ASENSIO, F.J.; SALAZAR, O.; COLLADO, J.; VICENTE, F.; BASILIO, A.; RUIBAL, C.; ROYO, I.; DE PEDRO, N.; PELÁEZ, F. Comparison of genotypic and phenotypic techniques for assessing the variability of the fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 36–45, 2002.
- ARENAL, F.; PLATAS, G.; MARTÍN, J.; SALAZAR, O.; PELÁEZ, F. Evaluation of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for assessing the genetic variability of isolates of the fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 898–906, 1999.
- ARENAL, F.; PLATAS, G.; MONTE, E.; PELÁEZ, F. ITS sequencing support for *Epicoccum nigrum* and *Phoma epicoccina* being the same biological species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 301–303, 2000.

ARENAL, F.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. Taxonomic reconsideration of *Epicoccum nigrum* and *Phoma epicoccina* based on DNA sequences and morphological observations. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 89, p. 465-471, 2004.

ARENAL, F.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. A new endophytic species of *Preussia* (*Sporormiaceae*) inferred from morphological observations and molecular phylogenetic analysis. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 25, p. 1-17, 2007.

ARIE, T.; KANEKO, I.; YOSHIDA, T.; NOGUCHI, M.; NOMURA, Y.; YAMAGUCHI, I. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, p. 1330-1339, 2000.

ARNOLD, E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 51-66, 2007.

ARNOLD, E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, Brooklyn, v. 88, p. 541-549, 2007.

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

ARROYO GARCÍA, R.; MARTÍNEZ ZAPATER, J. M.; GARCÍA CRIADO, B.; ZABALGOGEAZCOA, I. Genetic structure of natural populations of the grass endophyte *Epichlœ festucae* in semiarid grasslands. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 355-364, 2002.

AZEREDO, 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**, Heidelberg, v. 1, p. 205-208, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, 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.

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

BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CILGENIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and root rot diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 891-900, 2000.

BAHRIM, G.; ŞOPTICĂ, F. Correlative effect of solid media on yellow pigmentogenesis at an *Epicoccum* sp. Strain. **Roumanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 9, p. 757-762, 2004.

BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J. W.; LÉVESQUE, C. A. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. **Mycologia**, New York, v. 92, p. 510–521, 2000.

BAMFORD, P. C.; NORRIS, G. L. F.; WARD, G. Flavipin production by *Epicoccum* spp. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 44, p. 354–356, 1961.

BAUTE, M. A.; DEFFIEUX, G.; BAUTE, R.; NEVEU, A. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. I. Fermentation, isolation and antibacterial properties. **Journal of Antibiotics**, Tokio, v. 31, p. 1099–1105, 1978.

BELL, P. J. L.; KARUSO, P. Epicoccone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 125, p. 9304-9305, 2003.

BETTUCCI, L.; ALONSO, R.; TISCORNIA, S. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, p. 468-472, 1999.

BLEOJU, M. M.; GONZÁLEZ SANJOSÉ, M. L. Study about the stability and some technological properties of the pigments synthesized by *Epicoccum nigrum*. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, Galati, v. 1, p. 37–44, 2007.

BROWN, A. E.; FINLAY, R.; WARD, J. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 657–664, 1987.

BRUM, M. C. P. **Potencial biotecnológico de fungos endofíticos da videira**. 2008. 95p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2008.

BRUNS, T. D. ITS reality. **Inoculum**, New York, v. 52, p. 2-3, 2001.

BRUNS, T. D.; SHEFFERSON, R. P. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 82, p. 1122–1132, 2004.

BRUTON, B. D.; REDLIN, S. C.; COLLINS, J. K.; SAMS, C. E. Post harvest decay of cantaloupe caused by *Epicoccum nigrum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 1060–1062, 1993.

CAMATTI - SARTORI, V.; AZEVEDO, J. L.; SANHUEZA, R. M. V.; RIBEIRO, R. T. S.; ECHEVERRIGARAY, S. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 397-402, 2005.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 237–246, 2007.

CARBONE, I.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. **Evolution**, Lancaster, v. 53, p. 11-21, 1999.

CARROLL, G.; PETRINI, O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia**, New York, v. 75, p. 53–63, 1981.

CHOI, H. Y.; VEAL, D. A.; KARUSO, P. Epicocconone, a new cell-permeable long Stokes' shift fluorescent stain for live cell imaging and multiplexing. **Journal of Fluorescence**, New York, v. 16, p. 475-482, 2006.

COGHLAN, D. R.; MACKINTOSH, J. A.; KARUSO, P. Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with epicocconone. **Organic Letters**, Washington, v. 7, p. 2401–2404, 2005.

COLLADO-ROMERO, M.; MERCADO-BLANCO, J.; OLIVARES-GARCÍA, C.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, p. 1019-1028, 2008.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, p. 299-306, 2001.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; PONGPANICH, K.; HIMAMAN, W.; ARZANLOU, M.; WINGFIELD, M. J. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* sp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 457–469, 2004.

DABOUSSI, M. J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 275-299, 2003.

DANTI, R.; SIEBER, T. N.; SANGUINETI, G.; RADDI, P.; DI LONARDO, V. Decline in diversity and abundance of endophytic fungi in twigs of *Fagus sylvatica* L. after experimental long-term exposure to sodium dodecylbenzene sulphonate (SDBS) aerosol. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, p. 696-702, 2002.

DE CAL, M. A.; LARENA, I.; LIÑÁN, M.; TORRES, R.; LAMARCA, N.; USALL, J.; DOMENICHINI, P.; BELLINI, A.; ERIBE, X. O.; MELGAREJO, P. Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, p. 592–605, 2009.

DESPRÉS, L.; GIELLY, L.; REDOUTET, B.; TABARLET, P. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 27, p. 185-196, 2003.

- DOUHAN, G. W.; SMITH, M. E.; HUYN, K. L.; WESTBROOK, A.; BEERLI, P.; FISHER, A. J. Multigene analysis suggests ecological speciation in the fungal pathogen *Claviceps purpurea*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, p. 2276-2286, 2008.
- DOVER, G. A. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. **Nature**, London, v. 299, p. 111-117, 1982.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 214, 2007.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. 1792-1797, 2004.
- ELLIS, M. B. Dematiaceous Hyphomycetes. **Commonwealth Mycological Institute Kew**, Surrey. 1971.
- ERNST, M.; MENDGEN, K. W.; WIRSEL, G. R. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, p. 580-587, 2003.
- FISHER, P.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oriza sativa* L.). **New Phytologist**, London, v. 120, p. 137-143, 1992.
- FREDERICK, C. B.; SZANISZLO, P. J.; VICKEREY, P. E.; BENTLEY, M. D.; SHIVE, W. Production and isolation of siderophores from the soil fungus *Epicoccum purpurascens*. **Biochemistry**, Washington, v. 20, p. 2432-2436, 1981.
- GANLEY, A. R. D.; KOBAYASHI, T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. **Genome Research**, Woodbury, v. 17, p. 184-191, 2007.
- GANLEY, A. R. D.; SCOTT, B. Extraordinary ribosomal spacer length heterogeneity in a *Neotyphodium* endophyte hybrid: Implications for concerted evolution. **Genetics**, Bethesda, v. 150, p. 1625-1637, 1998.
- GANLEY, A. R. D.; SCOTT, B. Concerted evolution in the ribosomal RNA genes of an *Epichloë* endophyte hybrid: Comparison between tandemly arranged rDNA and dispersed 5S rRNA genes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 35, p. 39-51, 2002.
- GARBER, R. C.; TURGEON, B. G.; SELKER, E. U.; YODER, O. C. Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. **Current Genetics**, Berlin, v. 14, p. 573-582, 1988.
- GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 59, p. 1-10, 2007.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1323–1330, 1995.

GRIBANOVSKI-SASSU, O.; FOPPEN, F. H. The carotenoids of the fungus *Epicoccum nigrum* Link. **Phytochemistry**, Oxford, v. 6, p. 907–909, 1967.

GRÜNIG, C. G.; DUO, A.; SIEBER, T. N.; HOLDENRIEDER, O. Assignment of species rank to six reproductively isolated cryptic species of the *Phialocephala fortinii* s. lat.–*Acephala applanata* species complex. **Mycologia**, New York, v. 100, p. 47–67, 2008.

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

HASHEM, M.; ALI, E. H. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root rot of cotton seedlings. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 37, p. 283–297, 2004.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (eighth ed.), CAB International, Wallingford (1995).

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, Baltimore, v. 66, p. 411–453, 1991.

HINOJO, M. J.; LLORENS, A.; MATEO, R.; PATIÑO, B.; GONZÁLEZ-JAÉN M. T.; JIMÉNEZ, M. Utility of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms of the intergenic spacer region of the rDNA for characterizing *Gibberella fujikuroi* isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 681–688, 2004.

HONG, S. G.; LIU, D.; PRYOR, B. M. Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. reveals variable and conserved domains. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 87–95, 2005.

HUANG, H. C.; BREMER, E.; HYNES, R. K.; ERICKSON, R. S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, Orlando, v. 18, p. 270–276, 2000.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 33, p. 163–173, 2008.

IKAWA, M.; MCGRATTAN, C. J.; BURGE, W. R.; IANNITELLI, R. C. Epirocin, a polyene antibiotic from the mold *Epicoccum nigrum*. **Journal of Antibiotics**, Tokio, v. 31, p. 159–161, 1978.

IMMANUEL, V. Y.; NELSON, R. J. WINBOOT: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 1996.

- JOHNSTON, P. R. Leaf endophytes of manuka (*Leptospermum scoparium*). **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 1009-1016, 1998.
- KASUGA, T.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Estimation of nucleotide substitution rates in Eurotiomycete fungi. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, p. 2318–2324, 2002.
- KAWAMATA, H.; NARISAWA, K.; HASHIBA, T. Suppression of rice blast by phylloplane fungi isolated from rice plants. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 70, p. 131–138, 2004.
- KEMAMI WANGUN, H. V.; HERTWECK, C. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 5, p. 1702–1705, 2007.
- KEMAMI WANGUN, H. V.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C. Epicoccalone, a coumarin-type chymotrypsin inhibitor, and isobenzofuran congeners from an *Epicoccum* sp. associated with a tree fungus. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 2008, n. 22, p. 3781–3784, 2008.
- KILPATRICK, J. A.; CHILVERS, G. A. Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 77, p. 497–508, 1981.
- KOHN, L. M. Mechanisms of fungal speciation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 279–308, 2005.
- KONSTANTINOVA, P.; YLI-MATTILA, T. IGS–RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense*. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 321–331, 2004.
- KOOPMAN, W. J. M. Phylogenetic signal in AFLP data sets. **Systematic Biology**, Washington, v. 54, p. 197–217, 2005.
- KOOPMAN, W. J. M.; WISSEMANN, V.; DE COCK, K.; VAN HUYLENBROECK J.; DE RIEK, J.; SABATINO, G. J. H.; VISSER, D.; VOSMAN, B.; RITZ, C. M.; MAES, B.; WERLEMARK, G.; NYBOM, H.; DEBENER, T.; LINDE, M.; SMULDERS, M. J. M. AFLP markers as a tool to reconstruct complex relationships: a case study in *Rosa* (Rosaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 95, p. 353–366, 2008.
- KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 9, p. 81–91, 2002.
- LARENA, I.; DE CAL, A.; LIÑÁN, M.; MELGAREJO, P. Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 508–514, 2003.

LARENA, I.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P. Effects of stabilizers on shelf-life of *Epicoccum nigrum* formulations and their relationship with biocontrol of postharvest brown rot by *Monilinia* of peaches. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.102, p. 570–582, 2007.

LARENA, I.; MELGAREJO, P. Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 161-167, 2004.

LARENA, I.; TORRES, R.; DE CAL, A.; LIÑÁN, M.; MELGAREJO, P.; DOMENICHINI, P.; BELLINI, A.; MANDRIN, J. F.; LICHOU, J.; OCHOA DE ERIBE, X.; USALL, J. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. **Biological Control**, Orlando, v. 32, p. 305-310, 2005.

LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMON, M. R.; MORENO, V. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, p. 683–686, 2002.

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

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127–150, 1993.

LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 1109–1112, 2002.

MACKINTOSH, J. A.; CHOI, H. Y.; BAE, S. H.; VEAL, D. A.; BELL, P. J.; FERRARI, B. C.; VAN DYK, D. D.; VERRILLS, N. M.; PAIK, Y. K.; KARUSO, P. A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, p. 2273–2288, 2003.

MADRIGAL, C.; MELGAREJO, P. Morphological effects of *Epicoccum nigrum* and its antibiotic flavipin on *Monilinia laxa*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 425-431, 1995.

MADRIGAL, C.; PASCUAL, S.; MELGAREJO, P. Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Epicoccum nigrum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, p. 554–561, 1994.

MADRIGAL, C.; TADEO, J. L.; MELGAREJO, P. Relationship between flavipin production by *Epicoccum purpurascens* and antagonism against *Monilinia laxa*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 1375-1381, 1991.

MALINOWSKI, D. P., BELESKY, D. P. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 923–940, 2000.

- MAPARI S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 30, p. 2183-2190, 2008.
- MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 16, p. 231–238, 2005.
- MARI, M.; TORRES, R.; CASALINI, L.; LAMARCA, N.; MANDRIN, J. F.; LICHOU, J.; LARENA, I.; DE CAL, M. A.; MELGAREJO, P.; USALL, J. Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 1271–1277, 2007.
- MÁRQUEZ, L. M.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J. A virus in a fungus in a plant—three way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, Washington, v. 315, p. 513–515, 2007.
- MELGAREJO, P.; CARRILLO, R.; SAGASTA, E. Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 85, p. 313–317, 1985.
- MELGAREJO, P.; CARRILLO, R.; SAGASTA, E. Potential for biological control of *Monilinia laxa* in peach twigs. **Crop Protection**, Guildford, v. 5, p. 422–426, 1986.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento*. Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.
- MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 83, p. 1354-1363, 2005.
- MISHRA, P. K.; FOX, R. T. V.; CULHAM, A. Restriction analysis of PCR amplified nrDNA regions revealed intraspecific variation within populations of *Fusarium culmorum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 215, p. 291-296, 2002.
- MOY, M.; LI, H. M.; SULLIVAN, R.; WHITE, J. F. Jr.; BELANGER, F. C. Endophytic fungal β -1,6-glucanase expression in the infected host grass. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1298–1308, 2002.
- MUCCIARELLI, M.; SCANNERINI, S.; BERTEA, C.; MAFFEI, M. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, London, v. 158, p. 579–591, 2003.

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

MURILLO, C.; ALBERTAZZI, F. J.; CARRANZA, J.; LUMBSCH, H. T.; TAMAYO, G. Molecular data indicate that *Rhytidhysterium rufulum* (ascomycetes, Patellariales) in Costa Rica consists of four distinct lineages corroborated by morphological and chemical characters. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 405-416, 2009.

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

O'GORMAN, C. M.; FULLER, H. T.; DYER, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, London, v. 457, p. 471-474, 2009.

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 613-616, 2001.

PASCUAL, S.; MELGAREJO, P.; MAGAN, N. Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 156, p. 93-100, 2002.

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

PAŽOUTOVÁ, S.; KOLÍNSKÁ, R. Record of *Cerebella* sp. in Czech Republic and of *Cerebella andropogonis* in Brazil. **Czech Mycology**, Praha, v. 52, p. 81-88, 1999.

PAŽOUTOVÁ, S.; KOLÍNSKÁ, R. Relationship of *Cerebella* to *Epicoccum* and their closest relatives among Dothideales. **Czech Mycology**, Praha, v. 54, p. 155-160, 2003.

PECCHIA, S.; MERCATELLI, E.; VANNACCI, G. PCR amplification and characterization of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA in *Pyrenophora graminea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 166, p. 21-27, 1998.

PELÁEZ, F.; COLLADO, F.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DIEZ MATAS, M. T.; GARCIA, J. B.; GONZALEZ DEL VAL, A.; GONZALEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNANDEZ, P.; MARTIN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 755–761, 1998.

PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q. L.; HANADA, R. E. Diversidade de microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia brasileira. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento*. Recife: UFPE, 2007. p. 141-148.

PERELLÓ, A.; SIMON, M. R.; ARAMBARRI, A. M. Interactions between foliar pathogens and the saprophytic microflora of the wheat (*Triticum aestivum* L.) phylloplane. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 232–243, 2002.

PETERSON, S. W.; VEJA, F. E.; POSADA, F.; NAGAI, C. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia*, New York, v. 97, p. 659-666, 2005.

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

PIECKENSTAIN, F. L.; BAZZALO, M. E.; ROBERTS, A. M. I.; UGALDE, R. A. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 77-84, 2001.

PIMENTEL, G.; PEEVER, T. L.; CARRIS, L. M. Genetic variation among natural populations of *Tilletia controversa* and *T.bromi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 376-383, 2000.

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

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

PRAMATEFTAKI, P. V.; ANTONIOU, P. P.; TYPAS, M. A. The complete DNA sequence of the nuclear ribosomal RNA gene complex of *Verticillium dahliae*: intraspecific heterogeneity within the intergenic spacer region. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 29, p. 19-27, 2000.

PRINGLE, A.; BAKER, D. M.; PLATT, J. L.; WARES, J. P.; LATGE, J. P.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Evolution**, Oxford, v. 59, p. 1886–1899, 2005.

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

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

RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J.; VAN VOLKENBURGH, E.; HOY, M.; WRIGHT, L.; BECKWITH, F.; KIM, Y.; REDMAN, R. S. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 404-416, 2008.

- RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 1109-1114, 2008.
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1 manual. Applied Biostatistics, New York, 2000.
- ROMÃO, A. S.; ARAÚJO, W. L. Efeito do cultivo de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre a comunidade fúngica associada. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento*. Recife: UFPE, 2007. p. 150-159.
- ROMÃO, A. S.; MENDES, R.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar geneticamente modificada. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 25., 2006, São Pedro. **Resumos...** Piracicaba: Esalq, 2006. p. 122.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 1572-1574, 2003.
- SADAKA, N.; PONGE, J. F. Fungal colonization of phyllosphere and litter of *Quercus rotundifolia* Lam. in a holm oak forest (High Atlas, Morocco). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 9, p. 30–36, 2003.
- 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.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 315–340, 2004.
- SCHMID, F.; STONE, B. A.; BROWNLEE, R. T. C.; MCDUGALLD, B. M.; SEVIOUR, R. J. Structure and assembly of epiglucan, the extracellular β -glucan produced by the fungus *Epicoccum nigrum* strain F19. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 341, p. 365–373, 2006.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **ARLEQUIN, Version 2.000: A software for population genetics data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland, 2000.
- SCHOL-SCHWARZ, M. B. The genus *Epicoccum* Link. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 42, p. 149–173, 1959.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 996–1004, 2002.

SHU, Y. Z.; YE, Q.; LI, H.; KADOW, K. F.; HUSSAIN, R. A.; HUANG, S.; GUSTAVSON, D. R.; LOWE, S. E.; CHANG, L. P.; PIRNIK, D. M.; KODUKULA, K. Orevactaene, a novel binding inhibitor of HIV-1 rev protein to Rev response element (RRE) from *Epicoccum nigrum* WC47880. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 7, p. 2295-2298, 1997.

SIRRENBERG, A.; GÖBEL, C.; GROND, S.; CZEMPINSKI, N.; RATZINGER, A.; KARLOVSKY, P.; SANTOS, P.; FEUSSNER, I.; PAWLOWSKIA, K. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 131, p. 581–589, 2007.

SMITH S. A.; TANK D. C.; BOULANGER L. A.; BASCOM-SLACK, C. A.; EISENMAN, K.; et al. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, 2008. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0003052>. Acesso em: 20 fev. 2009.

ȘOPTICĂ, F.; BAHRIM, G. Influence of light upon flavonoid yields in *Epicoccum nigrum* solid state fermentation. **Roumanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 10, p. 2387-2394, 2005.

STERGIOPOULOS, I.; GROENEWALD, M.; STAATS, M.; LINDHOUT, P.; CROUS, P. W.; DE WIT, P. J. G. M. Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 415-429, 2007.

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

STOHR, S. N.; DIGHTON, J. Effects of species diversity on establishment and coexistence: a phylloplane fungal community model system. **Microbial Ecology**, New York, v. 48, p. 431–438, 2004.

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

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

TALBOT, N. J.; SALCH, Y. P.; MA, M.; HAMER, J. E. Karyotypic variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 585-593, 1993.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 8, p. 448–459, 2001.

- TAVARES, E. T.; TIGANO, M. S.; MELLO, S. C. M.; MARTINS, I.; CORDEIRO, C. M. T. Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p. 148-154, 2004.
- TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, p. 21–32, 2000.
- TORRES, M.; DOLCET, M. M.; SALA, N.; CANELA, R. Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 3328-3333, 2003.
- TREDWAY, L. P.; WHITE, J. F. J.; REDDY, P. V.; RICHARDSON, M. D.; CLARKE, B. B. Phylogenetic relationships within and between *Epichloe* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, p. 1593–1603, 1999.
- VARMA, A.; VERA, S.; SAHAY, N.; BÜTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407–4414, 1995.
- WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 13386–13391, 2005.
- WANGUN, H. V.; DAHSE, H. M.; HERTWECK, C. Epicoccamides B-D, glycosylated tetramic acid derivatives from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, p. 1800-1803, 2007.
- WEBSTER, R.; PACEY, M.; WINCHESTER, T.; JOHNSON, P.; JEZEQUEL, S. Microbial oxidative metabolism of diclofenac: production of 4'-hydroxydiclofenac using *Epicoccum nigrum* IMI354292. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, p. 371-376, 1998.
- WEI, J. G.; XU, T. *Pestalotiopsis kunmingensis* sp. nov. an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.15, p. 247-254, 2004.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A.; Gelfand D. H.; Sninsky J. J.; White T. J. (Eds.). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WIRSEL, S. G. R.; LEIBINGER, W.; ERNST, M.; MENDGEN, K. Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. **New Phytologist**, London, v. 149, p. 589–598, 2001.

WRIGHT, A. D.; OSTERHAGE, C.; KÖNIG, G. M. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish derived culture of *Epicoccum purpurascens*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 1, p. 507-510, 2003.

ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, X. Epicoccins A–D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, p. 1522–1525, 2007.

ZHOU, T.; REELEDER, R. D. Application of *Epicoccum purpurascens* spores to control white mold of snap bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 639–642, 1989.

ZHOU, T.; REELEDER, R. D.; SPARACE, S. A. Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and *Epicoccum purpurascens*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, p. 2503-2510, 1991.

ZWICKL, D. J. GARLI (Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference), Version 0.942, 2006. Disponível em: <http://www.bio.utexas.edu/grad/zwickl/web/garli.html>. Acessado em: 20 mar. 2009.

3 TRANSFORMAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO *Epicoccum nigrum* MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* E ANÁLISE DA INTERAÇÃO COM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*)

Resumo

Estudos recentes sobre a comunidade de fungos endofíticos de cana-de-açúcar mostraram que o fungo *Epicoccum nigrum* está presente de forma consistente nos tecidos desta planta. Esta espécie é comumente encontrada como endofítica em várias espécies de plantas e apresenta grande potencial biotecnológico, tanto para a produção de metabólitos secundários como para o controle biológico, mas pouco é conhecido sobre a natureza da interação endofítica desta espécie com hospedeiros de clima tropical. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivos: 1) adequar a metodologia de transformação mediada por *A. tumefaciens* para *Epicoccum*, visando à obtenção de linhagens marcadas com o gene repórter GFP; 2) avaliar a interação *in vitro* e *in vivo* de *Epicoccum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar; 3) investigar o efeito da colonização da linhagem selvagem e transformada de *Epicoccum* sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar. O gene de resistência a higromicina B (hph) foi utilizado como marcador de seleção. A frequência de transformantes (0,2 a 100,4 colônias por 10^5 conídios) variou dependendo da linhagem de *A. tumefaciens* utilizada como doadora do T-DNA e também das condições do co-cultivo. A estabilidade dos transformantes foi demonstrada pelo crescimento em higromicina B e expressão de GFP mesmo após sucessivas passagens em meio de cultura sem o antibiótico. A confirmação da transformação foi realizada por PCR e a análise de *Southern blot* revelou que 80% das linhagens investigadas apresentaram inserção única do T-DNA. As regiões que flanqueiam o T-DNA foram identificadas por TAIL-PCR e apresentaram de baixa a elevada similaridade com proteínas hipotéticas de fungos, demonstrando a utilidade desta metodologia como uma ferramenta de mutagênese insercional aleatória para este fungo. A interação *in vitro* e *in vivo* com plantas de cana-de-açúcar foi investigada por meio de análises de microscopia e reisolamento. Os resultados mostraram que *Epicoccum* eventualmente é capaz de penetrar o tecido hospedeiro por aberturas naturais como estômatos e que a colonização das raízes é superficial e não resulta em sintomas de doença. Por meio da análise de reisolamento, foi possível verificar que *Epicoccum* não somente coloniza os tecidos internos de cana-de-açúcar, mas também é capaz de persistir na comunidade epifítica das folhas. Não foram encontradas diferenças significativas quanto ao padrão de colonização entre as linhagens selvagem e transformada. O monitoramento das linhagens inoculadas foi realizado por meio da sensibilidade a higromicina B e por marcadores RAPD, permitindo a confirmação da identidade das linhagens introduzidas. A colonização pelas linhagens selvagem e transformada de *Epicoccum* não afetou o processo de aclimatização das plantas em casa de vegetação. No entanto, foi verificada maior alocação de biomassa para as raízes do que para a parte aérea das plantas e que a colonização diminuiu o acúmulo de massa fresca e seca, em comparação as plantas controle. Estes resultados indicam que nesta etapa do desenvolvimento da planta a presença do fungo afetou negativamente o crescimento, mas tendo em vista que em experimentos *in vitro* nenhum sintoma de doença foi observado, pode ser sugerido que a presença destes microrganismos somente resulta em aumento do *fitness* em condições específicas, como por exemplo, presença de patógenos e/ou pragas, como já relatado para outras interações envolvendo este fungo.

Palavras-chave: Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*; GFP; Colonização; Reisolamento; RAPD; Microscopia

3 *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED TRANSFORMATION OF THE ENDOPHYTIC FUNGUS *Epicoccum nigrum* AND ANALYSIS OF THE INTERACTION WITH SUGARCANE PLANTS (*Saccharum officinarum*)

Abstract

Recent works on sugarcane endophytic fungal community have shown the fungus *Epicoccum nigrum* can be often found in the different tissues of this host plant. This fungus is frequently found as an endophyte in a wide range of plants and has a great biotechnological potential for secondary metabolites as well as for biological control. However, little is known regarding the nature of the endophytic interaction between this fungus species and tropical host plants. Taking this into consideration the present study had as goals: 1) adjust *A. tumefaciens*-mediated transformation methodology to use with *Epicoccum*, in order to obtain GFP-expressing strains; 2) analysis *in vitro* and *in vivo* of the interaction GFP-expressing *Epicoccum*-sugarcane plants; 3) investigate growth effects resulting from the colonization of wild type and transformant *Epicoccum* strains into sugarcane plants. The hygromycin B (hph) gene was used as selectable marker. The transformation frequency (from 0.2 up to 100.4 colonies per 10^5 spores) varied according to the *A. tumefaciens* strain used as T-DNA transferring and co-cultivation conditions. The transformants stability was verified by the growth on hygromycin B and GFP expression after many successive transfers on non-selective media. The confirmation of T-DNA transference performed by PCR and *Southern-blot* revealed that 80% of assessed transformants had single integration of T-DNA into the genome. The identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions was accomplished by TAIL-PCR. These regions showed low to high similarity to hypothetical fungal proteins, indicating the usefulness of this methodology as a tool for random insertional mutagenesis in this fungus species. *In vivo* and *in vitro* interactions *Epicoccum*-sugarcane plants were investigated by microscopy and reisolation. The results showed that *Epicoccum* occasionally penetrates host tissues by natural openings as the stomata and that root colonization by this fungus is superficial and do not lead to development of any disease symptoms. The reisolation assay revealed that *Epicoccum* is able to colonize not only inner tissues of sugarcane but also is able to persist in the epiphytic leaf community of this plant. In addition, there was no significant difference between colonization patterns of wild type and transformant strains. The inoculated strains were monitored by hygromycin B sensitivity and RAPD markers, confirming the identity of the strains. The colonization by wild type and transformant *Epicoccum* strains did not interfere on plant acclimatization in the greenhouse. However, it was possible to observe a greater biomass allocation into the roots rather than aerial plant parts and also a reduction on fresh and dry weight compared to control plants. These results show that at this phase of plant development the fungus negatively affected plant growth, nevertheless, considering that the *in vitro* plants did not develop any disease symptom it can be suggested that these microorganisms only lead to raise in fitness under specific conditions, for instance, as previously reported, they can be valuable when there are other pathogens and/or pests colonizing the plant.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; GFP; Colonization; Reisolation; RAPD; Microscopy

3.1 Introdução

A capacidade de formar associações mutualistas com microrganismos é uma das estratégias bem sucedidas que as plantas evoluíram para adaptação a diferentes condições de estresse, tanto bióticos como abióticos, existentes no ambiente terrestre (TANAKA et al., 2006; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). As relações mais estudadas são as associações entre as raízes de plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio e entre fungos micorrízicos arbusculares e mais de 80% das espécies de plantas terrestres (PARNISKE, 2004; DEAKIN; BROUGHTON, 2009). Bem menos conhecidas, mas igualmente importantes devido aos efeitos bioprotetores, são as simbioses entre plantas e fungos endofíticos (SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004; HYDE; SOYTONG, 2008; RODRIGUEZ et al., 2009).

De modo geral, dois grupos de fungos endofíticos têm sido reconhecidos: fungos endofíticos clavicipitáceos, os quais são associados a algumas espécies de gramíneas de clima temperado, e não clavicipitáceos, os quais colonizam tecidos assintomáticos de todas as espécies conhecidas de plantas (SIEBER, 2007; ARNOLD, 2007). As funções dos endófitos clavicipitáceos são bastante estudadas, por exemplo, estes fungos podem conferir proteção contra insetos herbívoros pela produção de alcalóides, contra patógenos e contra diferentes tipos de estresse abiótico, tais como tolerância a escassez hídrica e a metais pesados, além de induzirem o acúmulo de biomassa vegetal (AZEVEDO et al., 2000; MALINOWSKI; BELESKY, 2000; CHEPLICK, 2006; HARTLEY; GANGE, 2009).

As funções dos fungos endofíticos não clavicipitáceos são bem menos conhecidas. Embora existam mais de 1000 artigos científicos publicados sobre estes fungos desde 1970 (RODRIGUEZ et al., 2009), poucos trabalhos investigaram a relação simbiótica *in planta*. A pesquisa sobre endófitos não clavicipitáceos tem sido voltada para a descrição de espécies em tecidos assintomáticos, produção de metabólitos bioativos, potencial de utilização para o controle biológico e análises de sistemática baseada em filogenia (SCHULZ; BOYLE, 2005; SAIKKONEN, 2007; HIGGINS et al., 2007; SMITH et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2009). Nos casos onde a interação *in planta* foi avaliada, as funções destes fungos parecem ser bem mais diversas, como revisado recentemente por Rodriguez et al. (2009).

Mesmo com o avanço da biologia molecular, o estudo da interação endofítica ao nível celular e molecular é relativamente recente e voltado para os endófitos clavicipitáceos

(PANACCIONE et al., 2001; SPIERING et al., 2005; FELITTI et al., 2006; TANAKA et al., 2006; SCHÄFER; KHATABI; KOGEL, 2007) e a maior parte do que se conhece sobre as relações envolvendo fungos endofíticos ainda é restrita às suas conseqüências finais. Menos ainda é conhecido sobre a interação entre endófitos e outros microrganismos naturalmente associados à filosfera e rizosfera das plantas (ARAÚJO et al., 2001, BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; WICKLOW; POLING, 2009).

Em sua maioria, as funções dos endófitos foram acessadas em plantas de clima temperado, e o fato que a diversidade fúngica é conhecida por ser maior em regiões tropicais (AZEVEDO et al., 2000; ARNOLD; LUTZONI, 2007), justifica a realização de estudos da interação endofítica nestas regiões. Na tentativa de contribuir para o conhecimento sobre as relações entre microrganismos endofíticos e plantas tropicais, o grupo de pesquisa do qual este trabalho faz parte tem investigado as comunidades microbianas associadas à *Saccharum officinarum*, uma planta de grande importância econômica e social para o Brasil. Em relação a esta cultura, o Brasil se destaca como maior produtor mundial, com uma área de cerca de 7 milhões de hectares e uma produção de aproximadamente 500 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2007/2008 (www.unica.com.br). Investimentos do setor público e privado garantem avanços no conhecimento e novas estratégias para o melhoramento genético desta planta, principalmente para a produção de biocombustível (<http://bioenfapesp.org>).

Neste contexto, progressos significativos no conhecimento sobre as comunidades microbianas da filosfera e da rizosfera de cana-de-açúcar têm sido alcançados recentemente (ARAÚJO; KUKLINSKY-SOBRAI, 2004; STUART, 2006; ROMÃO; ARAÚJO, 2007; MARCON, 2007; MENDES et al., 2007; MENDES, 2008; ROSSETO, 2008; SILVA, 2008; LUVIZOTTO, 2008; GONZALEZ, 2008; AZEVEDO, 2008) abrindo um campo de investigação sobre a função de diferentes espécies bacterianas e fúngicas na interação com a planta hospedeira bem como sua possível aplicação biotecnológica, como tem sido sugerido para as bactérias endofíticas diazotróficas fixadoras de nitrogênio cuja interação com cana-de-açúcar já é bastante estudada (BALDANI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2009).

Um grande avanço no conhecimento da interação fungo-planta tem sido relatado com base na disponibilidade de diferentes métodos de transformação de fungos (FINCHAM, 1989; KAHMANN; BASSE, 1999; MULLINS; KANG, 2001). Além disso, diferentes estratégias de mutagênese insercional aleatória ou sítio-específica e silenciamento gênico pós-transcricional têm

sido desenvolvidas como ferramentas eficientes para investigar a função gênica em fungos filamentosos (LORENZ, 2002; WELD et al., 2006; NAKAYASHIKI; NGUYEN, 2008). A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é amplamente utilizada para manipulação genética de plantas (NEWELL, 2000; TZFIRA; CITOVSKY, 2006) e foi adaptada com sucesso para *Saccharomyces cerevisiae* (BUNDOCK et al., 1995) e para fungos filamentosos (GROOT et al., 1998). De fato, dezenas de espécies de fungos e oomicetos têm sido transformadas por esta metodologia, incluindo não somente espécies patogênicas e mutualistas, mas também espécies utilizadas no biocontrole e na indústria (MICHIELSE et al., 2005; LACROIX et al., 2006). A preferência por esta metodologia está relacionada a vantagens como a versatilidade na escolha do material inicial, elevada eficiência de transformação e alta porcentagem de inserções únicas no genoma, características que facilitam o isolamento das seqüências flanqueadoras do T-DNA por técnicas como PCR inverso ou TAIL-PCR (MICHIELSE et al., 2005; WELD et al., 2006).

O estudo da interação entre fungos e plantas também tem sido facilitado pela introdução de genes repórteres, como o gene da β -D-glicoronidase, *gusA*, de *Escherichia coli*, o gene *gfp* da água viva *Aequorea victoria*, e outras versões de proteínas autofluorescentes como a proteína vermelha fluorescente (DsRed) do coral *Discosoma striata* (LORANG, 2001; MIKKELSEN et al., 2003; LARRAINZAR; O'GARA; MORRISSEY, 2005). A preferência pela utilização de GFP no estudo das relações fungo-planta se deve à alta estabilidade desta proteína, a qual necessita apenas de UV ou luz azul e oxigênio para emissão de fluorescência, não requerendo cofatores ou substratos para atividade, como em outros sistemas repórteres (β -D-glicoronidase, β -galacturonidase e luciferase) (LORANG, 2001).

Esta tecnologia tem sido aplicada com sucesso em estudos ecológicos de espécies empregadas no biocontrole de insetos (INGLIS et al., 2000; HU; St. LEGER, 2002; CAO et al., 2007) e de fitopatógenos (BAE; KNUDSEN, 2000; LÜBECK et al., 2002; SARROCCO et al., 2006; ZHANG et al., 2008; PANTELIDES et al., 2009). Tais investigações permitem não somente o monitoramento da dinâmica de populações e da persistência desses organismos no ambiente, mas também a análise de interações na interface micoparasita-patógeno-planta (LU et al., 2004; NEVEU; LABBÉ; BÉLANGER, 2007). Proteínas autofluorescentes também têm sido importantes para a análise de interações mutualistas entre plantas e fungos micorrízicos (HANIF et al., 2002; GRIMALDI et al., 2005; RODRÍGUEZ-TOVAR, et al., 2005; MÜLLER et al., 2006; MARTINO et al., 2007; HELBER; REQUENA, 2008).

Em relação aos fungos endofíticos, a expressão de GFP foi relatada para os endófitos clavicipitáceos *Neotyphodium lolli* (MIKKELSEN et al., 2001) e *Epichloë festucae* (TANAKA et al., 2006), e também para *Acremonium implicatum* (ABELLO; KELEMU; GARCÍA, 2008), *A. strictum* (GRUNEWALDT-STÖCKER; RIEDIGER; DIETRICH, 2007) e *Phialocephala fortinii* (GORFER et al., 2007). O sistema GUS também tem sido útil para estudos da biologia da interação dos endófitos clavicipitáceos, permitindo a análise da distribuição da atividade metabólica e expressão gênica *in planta* (MURRAY; LATCH; SCOTT, 1992; HERD et al., 1997; ZHANG et al., 2006). Além da análise por meio de microscopia, uma das estratégias utilizadas para avaliar a capacidade de estabelecimento de uma interação endofítica com a planta hospedeira é baseada na inoculação e reisolamento do fungo endofítico e na utilização dos postulados de Koch (SCHULZ, 1998, 1999; REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; SIEBER, 2007). Tais abordagens, associadas à utilização de linhagens marcadas com genes repórteres podem facilitar o reisolamento do fungo introduzido, constituindo uma estratégia inicial útil para acessar o padrão de colonização endofítica e as possíveis funções e respostas das plantas aos endófitos não clavicipitáceos.

Em relação à comunidade de fungos endofíticos de *S. officinarum*, Stuart (2006), Romão e Araújo (2007) e Mendes (2008) verificaram por meio de isolamento e técnicas independentes de cultivo, que o fungo *Epicoccum nigrum* está presente em tecidos de cana-de-açúcar. Por ser uma espécie comumente encontrada em associação com esta cultura, o estudo da interação endofítica com esta planta pode contribuir para o entendimento sobre a plasticidade da simbiose entre fungos endofíticos e plantas tropicais. *E. nigrum* Link é comumente associado ao filoplano (SADAKA; PONGE, 2003; KAWAMATA; NARISAWA; HASHIBA, 2004; STOHR; DIGHTON, 2004; OSONO, 2007), mas também tem sido reportado como endófito em várias espécies de plantas (FISHER; PETRINI, 1992; WIRSEL et al., 2001; DANTI et al., 2002; LARRAN et al., 2007).

Esta espécie apresenta metabolismo secundário altamente desenvolvido e diverso, sendo conhecida por produzir diferentes compostos com atividades biológicas tais como, atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante e citotóxica, bem como pigmentos carotenóides e compostos fluorescentes (capítulo 2 e referências citadas), e também pela capacidade de biocontrole de fitopatógenos (WITTIG; JOHNSON; PSCHIEDT, 1997; PIECKENSTAIN et al., 2001; HASHEM; ALI, 2004; MARI et al., 2007; DE CAL, 2009). Apesar do grande potencial

biotecnológico, pouco é conhecido sobre a natureza da interação endofítica de *E. nigrum* com hospedeiros de clima tropical.

Nesse contexto, para o entendimento de alguns aspectos básicos da biologia da interação deste fungo com cana-de-açúcar, este trabalho teve por objetivos estabelecer e otimizar um sistema de transferência de genes mediado por *A. tumefaciens* para linhagens endofíticas de *E. nigrum*, bem como obter transformantes estáveis quanto à expressão da proteína verde fluorescente (GFP). Além disso, este estudo avaliou a capacidade de *E. nigrum* em estabelecer uma interação endofítica com plantas de cana-de-açúcar utilizando duas abordagens: microscopia e reisolamento. As respostas de plantas de cana-de-açúcar à colonização pelas linhagens selvagem e transformada de *E. nigrum* também foram investigadas em casa de vegetação e algumas implicações da modificação genética de endófitos no comportamento destes fungos *in planta* são discutidas.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Linhagens, vetor de transformação e condições de cultivo

As linhagens monospóricas P16 (*E. nigrum*) e TH2 (*Epicoccum* sp.) utilizadas neste trabalho foram previamente isoladas de folhas saudáveis de cana-de-açúcar (capítulo 2) e mantidas em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar, Difco). As linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* EHA105 e LBA4404 foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Carlos Labate (Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil) e foram mantidas em meio de cultura AB (CHILTON et al., 1974) suplementado com 100 µg.ml⁻¹ de rifampicina (para ambas as linhagens) e 300 µg.ml⁻¹ de estreptomicina (para a linhagem LBA4404).

O vetor binário de transformação de fungos pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003) foi gentilmente cedido por Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália). Este vetor binário contém, na região T-DNA, o gene de resistência a higromicina B de *E. coli*, *hph*, dirigido pelo promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *gpd*, de *Glomerella cingulata*, bem como o gene da proteína verde fluorescente, *gfp* (pGreen Lantern, Life Technologies),

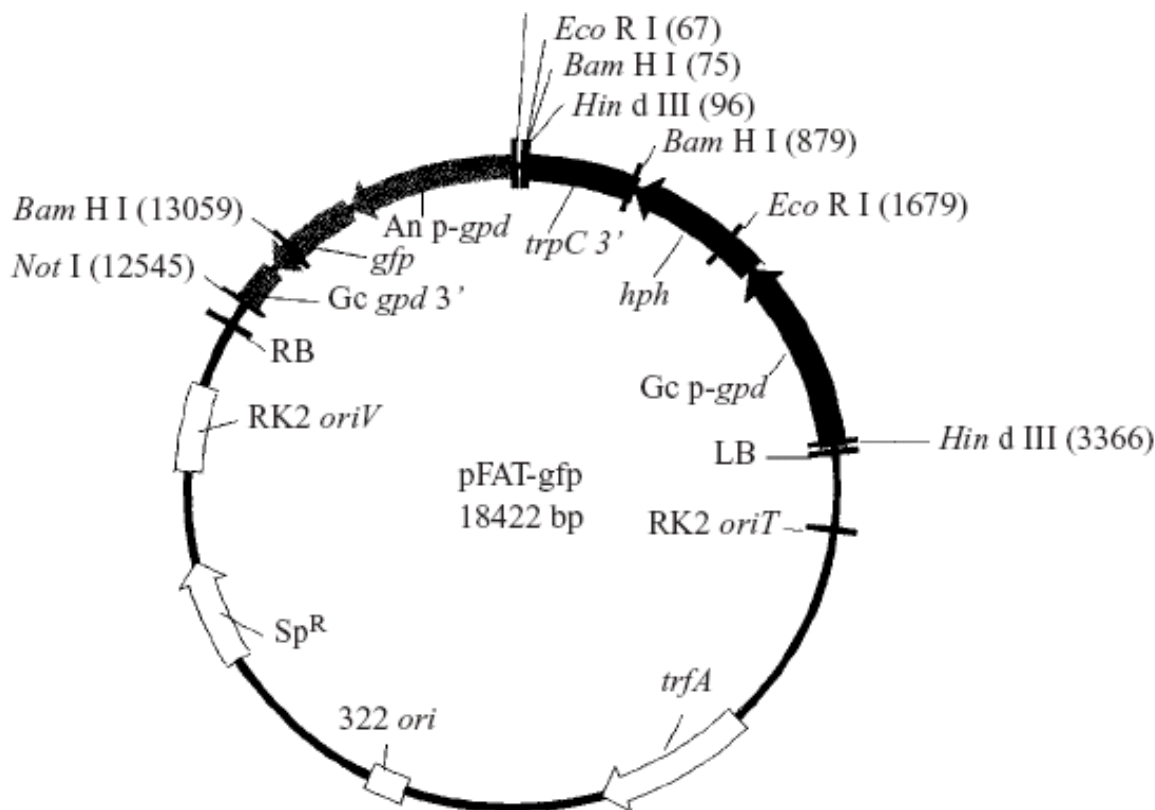


Figura 3.1 – Mapa do vetor de transformação de fungos mediada por *A. tumefaciens* pFAT-gfp, desenvolvido por Fitzgerald et al. (2003) e gentilmente cedido por Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália) para realização deste trabalho. (RB) Borda direita do T-DNA. (LB) Borda esquerda do T-DNA. (*hph*) Gene de resistência a higromicina B de *E. coli*. (*trpC 3'*) Signal de terminação transcricional do gene *trpC* de *A. nidulans*. (*An p-gpd*) Promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato de *A. nidulans*. (*Gc p-gpd*) Promotor do gene *gpd* de *G. cingulata*. (*Gc gpd 3'*) Signal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata*. (*Sp^R*) Gene de resistência a espectinomicina. (*RK2 oriV*) Origem de replicação vegetativa RK2. (*RK2 oriT*) Origem de transferência RK2. (*322 ori*) Origem de replicação de pBR322. (*trfA*) Gene de replicação *trfA* de RK2. (*gfp*) Gene da proteína verde fluorescente pGreen Lantern (Life Technologies). Fonte: Fitzgerald et al. (2003)

dirigido pelo promotor do gene *gpd* de *Aspergillus nidulans* (Figura 3.1). Células eletrocompetentes das linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* foram preparadas conforme estabelecido por Lacorte e Romano (1998) e transformadas com o vetor pFAT-gfp. As células transformadas foram selecionadas em meio de cultura YEP (10g extrato de levedura; 10g bacto peptona; 5g NaCl; 15g ágar; 1000 mL água destilada; pH 7,0) suplementado com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de espectinomicina (Sigma) e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de rifampicina (Sigma). Células de *E. coli* DH5 α foram utilizadas para manutenção do vetor pFAT-gfp, em meio de cultura Luria-Bertani suplementado com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de espectinomicina (Sigma).

3.2.1.2 Teste de sensibilidade a higromicina B

Discos de micélio de 8 mm de diâmetro das linhagens P16 e TH2, crescidas em meio de cultura BDA (Difco) durante 10 dias a 28°C, foram transferidos para placas de Petri contendo 10 mL deste mesmo meio acrescido de diferentes concentrações (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de higromicina B (Invitrogen, Brasil). O crescimento das linhagens foi monitorado até o momento em que as colônias das placas controle (sem antibiótico) atingiram a extremidade da placa. A concentração de higromicina B que inibiu totalmente o crescimento micelial foi escolhida para os experimentos de transformação.

3.2.1.3 Obtenção e preparo dos conídios

Discos de micélio das linhagens P16 e TH2 crescidas em meio BDA (Difco) foram inoculados sobre fragmentos foliares autoclavados de cana-de-açúcar, em placas de Petri contendo ágar-água (1,5% p/v). As placas foram incubadas a 28°C com fotoperíodo de 16 horas durante 15 a 25 dias. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de água destilada esterilizada e os conídios foram removidos com auxílio de alça de Drigalski. A suspensão de conídios foi filtrada em quatro camadas de gaze esterilizada para remoção de restos miceliais e a concentração de conídios foi determinada por contagem em câmara de Newbauer. Após centrifugação (5000 rpm por 10 minutos) o precipitado contendo conídios foi armazenado a 4°C até o momento do uso. Este procedimento foi realizado no mesmo dia do experimento de transformação.

Visto que os experimentos de transformação foram realizados com conídios germinados, foi necessário determinar o tempo no qual os conídios iniciam a germinação em meio líquido. Para tanto, foram preparados 25 mL de meio caldo batata (200g de batata cozida, 20g de glicose, 1000 mL de água destilada, pH 6,8) contendo 1×10^5 conídios. mL^{-1} . Esta suspensão foi incubada a 28°C sob agitação constante (100 rpm) e os conídios foram periodicamente monitorados ao microscópio óptico (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas) quanto à emissão de tubo germinativo. O tempo no qual a maioria dos conídios apresentava tubo germinativo visível foi escolhido para os experimentos de transformação.

3.2.1.4 Transformação mediada por *A. tumefaciens*

Com o objetivo de otimizar as condições de transformação, vários parâmetros foram investigados para a linhagem P16 de *E. nigrum*. A metodologia utilizada seguiu basicamente o

protocolo descrito por Groot et al. (1998), com modificações. Inicialmente, colônias isoladas das linhagens EHA105 e LBA4404 de *A. tumefaciens*, contendo o vetor binário pFAT-gfp, foram transferidas para 20 mL de meio de cultura YEP líquido, acrescido dos antibióticos espectinomicina e rifampicina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os frascos foram incubados a 28°C sob agitação (200 rpm) durante 16 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas para uma densidade óptica de 0,15 (OD_{660}) em meio de indução (10 mM K_2HPO_4 ; 10 mM KH_2PO_4 ; 2,5 mM NaCl; 2 mM MgSO_4 ; 0,7 mM CaCl_2 ; 9 μM FeSO_4 ; 4 mM NH_4SO_4 ; 10 mM glicose; 0,5% glicerol; 40 mM ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, pH 5,3, e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem) acrescido de 200 μM de acetoseringona (Fluka).

As culturas diluídas foram incubadas até alcançar uma densidade óptica de 0,6 (OD_{660}) e então misturadas com conídios germinados da linhagem P16 de *E. nigrum*, de modo a obter uma suspensão de células de *A. tumefaciens* contendo 1×10^5 conídios. mL^{-1} . Esta mistura foi inoculada (200 μL) em membranas de papel filtro (8 μm , J. Prolab, Brasil), nitrocelulose (0,45 μm , BioRad) e nylon (0,45 μm , Amersham Hybond N⁺ ou GE Healthcare) sobre meio de co-cultivo acrescido de 200 μM ou 400 μM de acetoseringona. O meio de co-cultivo é o mesmo meio de indução acrescido de ágar (1,5% p/v) e contendo 5 mM ao invés de 10 mM de glicose. A mistura de células bacterianas e conídios foi cuidadosamente espalhada sobre as membranas com auxílio de alça de Drigalski, de modo que a suspensão não ultrapassasse a borda das membranas. As placas de co-cultivo foram incubadas a 25°C na ausência de luz durante 48 e 96 horas. As membranas foram transferidas para meio seletivo BDA (caldo batata contendo 1,5% de ágar) acrescido dos antibióticos higromicina B ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para seleção dos transformantes, e cefoxitina sódica ($300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Eurofarma) para eliminação das células de *A. tumefaciens*.

Os transformantes obtidos após 7 a 20 dias de incubação a 28°C foram transferidos para placas contendo meio de cultura seletivo e armazenados para as análises posteriores. Os experimentos controle foram realizados sem a adição de acetoseringona. O número de colônias resistentes a higromicina B obtido em cada condição avaliada (5 placas de Petri para cada combinação de parâmetros) foi anotado e as médias (transformantes por 10^5 conídios) foram calculadas com auxílio do software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

Para verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos no experimento de otimização, foram realizados dois experimentos independentes utilizando apenas a linhagem EHA105 de *A. tumefaciens*. Nestes experimentos, quatro parâmetros foram investigados: linhagem fúngica (P16

e TH2), concentração de acetoseringona durante o co-cultivo (200 e 400 μM), tempo de co-cultivo (48 e 96 horas) e tipo de membrana empregada no co-cultivo (papel filtro e nylon). Cada combinação de parâmetros foi considerada um tratamento distinto, num total de 16 tratamentos. Para cada condição avaliada foram utilizadas 5 placas de Petri, sendo que cada placa constituiu uma repetição, em um delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram analisados utilizando o programa SAS (Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), onde foi aplicado teste de Tukey para as médias do número de transformantes obtidos, ao nível de 5% de significância.

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

Transformantes escolhidos aleatoriamente (5 de cada linhagem transformada) foram analisados quanto à expressão do gene *gfp*, por meio de microscopia de fluorescência. Para visualização do micélio, foram preparadas placas contendo meio BDA (Difco) suplementado com higromicina B (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sobre as quais foram colocadas lamínulas de vidro esterilizadas. Nas laterais de cada lamínula e adjacente ao meio de cultura, foram inoculados pequenos fragmentos miceliais dos transformantes, provenientes de culturas crescidas em meio de cultura seletivo. As placas foram incubadas a 28°C por 4-7 dias. As lâminas foram preparadas com água destilada esterilizada, vedadas com esmalte incolor e diretamente analisadas ao microscópio.

Para visualização de fluorescência nos conídios, os transformantes foram cultivados a 28°C por 15 a 25 dias em meio BDA (caldo batata acrescido de 1,5% de ágar e contendo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de higromicina B) com fotoperíodo de 16 horas. Os conídios foram transferidos para lâminas de vidro contendo água destilada esterilizada, as quais foram cobertas com lamínula e preparadas conforme descrito anteriormente. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) com o filtro indicado para análise de GFP. As amostras foram excitadas utilizando filtro de 490 nm e as imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio, com auxílio do software ISIS (Meta Systems, Alemanha). As linhagens selvagens P16 e TH2 foram utilizadas como controle.

3.2.1.6 Análise da estabilidade dos transformantes

Para a análise da estabilidade mitótica, 149 transformantes foram escolhidos aleatoriamente (72 da linhagem P16 e 77 da linhagem TH2). Antes de iniciar os testes de

estabilidade, colônias monospóricas (monoconidiais) foram obtidas por meio de semeadura de uma suspensão de conídios em meio BDA (Difco), acrescido de higromicina B ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Os transformantes foram repicados, 10 vezes consecutivas em meio BDA (Difco) sem a adição do agente seletivo, por meio da transferência de extremidades das hifas. Após as repicagens sucessivas, conídios provenientes das colônias da última passagem foram semeados em meio de cultura BDA (Difco) suplementado com $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de higromicina B. A porcentagem de transformantes estáveis foi calculada por regra de três simples. Alguns transformantes foram analisados ao microscópio de epifluorescência, para verificar se a expressão de *gfp* foi mantida após transferências sucessivas na ausência do agente seletivo.

3.2.1.7 Confirmação da transformação por PCR de colônia

A confirmação da transformação foi realizada por meio da amplificação dos genes *gfp* e *hph* presentes na região T-DNA. Para tanto, o DNA dos transformantes foi extraído diretamente dos conídios, utilizando a metodologia proposta por He et al. (2007), com modificações. Os conídios foram transferidos para microtubos de 1,5 mL (dois microtubos para cada amostra) contendo 0,5 cm de sílica esterilizada e 500 μL de tampão CTAB (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA, pH 8; 1,4 M NaCl, 1% polivinilpirrolidona-4000, 40 mM β -mercaptoetanol) (CULLINGS, 1992). As amostras foram homogeneizadas em vortex (2 min) e incubadas a 65°C (30 min). Em seguida, os tubos foram agitados (2 min) e novamente incubados a 65°C (30 min). 500 μL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) foram adicionados e as amostras foram centrifugadas (14000 rpm, 10 min). A fase aquosa foi transferida para novo microtubo e o DNA genômico foi precipitado pela adição de 0,08 volumes de NH_4OAc 7,5 M e 0,54 volumes de isopropanol. Após centrifugação (14000 rpm, 10 min) foram adicionados 10 μL de água ultrapura (Milli-Q) esterilizada e as amostras extraídas em duplicata foram transferidas para um único tubo, resultando em um volume final de 20 μL .

Um volume de 2 μL do DNA extraído dos conídios foi diretamente utilizado como molde nas reações de PCR. O DNA do vetor pFAT-*gfp* foi extraído de células de *E. coli* DH5 α (UltraClean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit, MOBIO Laboratories) e utilizado como controle positivo das reações. A amplificação do gene *gfp* foi realizada com os primers *glGFP5* (5'–GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC–3') e *glGFP3* (5'–GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC–3') (FITZGERALD et al., 2003)

enquanto que o gene *hph* foi amplificado com os primers *hph1* (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e *hph2* (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3') (MALONEK; MEINHARDT, 2001).

As reações foram preparadas em volume final de 25 μL , com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de MgCl_2 ; Tampão 1x (50mM de KCl e 20mM de Tris-HCl - pH 8,4); 0,05 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil) e 0,2 μM de cada iniciador. Para o controle positivo, 20 ng de DNA plasmidial foram utilizados como molde. A amplificação foi realizada em termociclador PTC – 200 (MJ Research) com desnaturação inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 1 min a 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min a 60 $^{\circ}\text{C}$ e 1 min a 72 $^{\circ}\text{C}$ e extensão final de 7 min a 72 $^{\circ}\text{C}$. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados sobre luz UV.

3.2.1.8 Extração de DNA e análise de *Southern Blot*

O DNA genômico de 10 transformantes da linhagem P16 de *E. nigrum* foi extraído de acordo com Raeder e Broda (1985). Para determinar o número de inserções do T-DNA, 15 μg de DNA dos transformantes e da linhagem P16, bem como 2 μg de DNA do vetor pFAT-gfp, foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, Brasil). A região T-DNA do vetor pFAT-gfp apresenta dois sítios de reconhecimento para esta endonuclease, ambos localizados no cassete de expressão do gene de resistência a higromicina B. Um sítio está localizado no sinal de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans* e o outro sítio está localizado na região intermediária do gene *hph* (FITZGERALD et al., 2003). Desse modo, quando o gene *hph* é utilizado com sonda, todos os transformantes, assim como o vetor pFAT-gfp, apresentarão uma banda de 1612 pb, e uma ou mais bandas de tamanhos diferentes, dependendo do número de inserções do T-DNA.

O DNA clivado foi separado em gel de agarose 0,8% e os procedimentos padrões descritos por Sambrook e Russel (2001) foram utilizados para transferência do gel para membrana de nylon (0,45 μm , Amersham Hybond N $^{+}$, GE Healthcare). O gene *hph*, utilizado como sonda, foi amplificado a partir do vetor pFAT-gfp com os primers *hph1* e *hph2* e purificado com UltraClean $^{\text{TM}}$ PCR Clean-Up Kit (MOBIO Laboratories). A marcação e hibridização da sonda foram realizadas utilizando o sistema de fosfatase alcalina termoestável (Amersham

AlkPhos Direct™ Labeling and Detection Systems, GE Healthcare), sob condições de alta estrigência (60°C), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.1.9 Amplificação, clonagem e seqüenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA

As regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA foram identificadas por meio da técnica TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction) (LIU; WHITTIER, 1995). Esta metodologia consiste de três reações de PCR sucessivas, utilizando primers “*nested*” específicos para as seqüências das bordas do T-DNA juntamente com um primer arbitrário e degenerado (AD) de seqüência curta, e a eficiência de amplificação de produtos específicos e não específicos pode ser controlada pela temperatura (COMBIER et al., 2003). No presente trabalho foram construídos primers específicos para as seqüências das bordas esquerda e direita do T-DNA do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003). Os primers da borda esquerda foram LB1-1 (5'-GTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG-3'), LB2-2 (5'-CCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTAC-3') e LB3-1 (5'-CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3') e os da borda direita foram RB1 (5'-AAGATGGGCAGTCTTTCAGAAGGG-3'), RB2-2 (5'-ATCGCAAAGTGAAGTCTTGCTGCC-3') e RB3-2 (5'-CCAAACGTAAAACGGCTTGTCCTCCGC-3'). Os primers específicos da borda esquerda utilizados nas reações secundária e terciária (LB2-2 e LB3-1, respectivamente) foram posicionados a uma distância de 105 pb um do outro, para facilitar a confirmação da especificidade do produto por meio de comparação do tamanho das bandas geradas. Os primers específicos para a borda direita do T-DNA (RB2-2 e RB3-2) foram posicionados a uma distância de 82 pb um do outro.

O DNA genômico dos transformantes foi extraído de acordo com Raeder e Broda (1985) e utilizado como molde nas reações de TAIL-PCR. Os primers arbitrários utilizados (AD1, AD2 e AD3) e a composição das reações de PCR foram as mesmas descritas por Liu et al. (1995). A amplificação por TAIL-PCR foi realizada seguindo as condições propostas por Mullins et al. (2001). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC – 200 (MJ Research). Para cada transformante, os produtos gerados nas reações primária, secundária e terciária foram analisados lado a lado em gel de agarose 1,2%. Todos os fragmentos obtidos na reação terciária que mostraram diminuição do comprimento consistente com a posição dos

primers na região T-DNA (em comparação aos produtos da reação secundária) foram considerados como sendo as junções do T-DNA (COMBIER et al., 2003).

Os produtos das reações terciárias foram purificados do gel de agarose, clonados em plasmídeo pGEM-T Easy (Promega, Brasil) e transformados em células de *E. coli* DH5 α . A amplificação do inserto foi realizada por PCR de colônia, utilizando os primers universais M13. As reações foram preparadas em volume final de 50 μ L, com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de MgCl₂; Tampão 1x (50mM de KCl e 20mM de Tris-HCl - pH 8,4); 0,05 U. μ L⁻¹ de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil) e 0,2 μ M de cada primer. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94^oC por 4 min, com 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 1 min a 94^oC, 1 min a 60^oC e 2 min a 72^oC e extensão final de 10 min a 72^oC. Os produtos de PCR foram purificados (UltraClean™ PCR Clean-Up Kit, MOBIO Laboratories) e seqüenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo, Brasil. Posteriormente, a região correspondente ao T-DNA foi retirada e as seqüências flanqueadoras restantes foram analisadas com auxílio da ferramenta BLAST (BlastN, BlastX e TblastX) contra a base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As seqüências também foram analisadas quanto à presença de ORFs (*open reading frame*) com auxílio da ferramenta ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2.1.10 Interação entre *E. nigrum* e plantas de cana-de-açúcar

Com o objetivo de avaliar a capacidade de *E. nigrum* de colonizar endofiticamente os tecidos de cana-de-açúcar, duas abordagens foram utilizadas no presente trabalho: análise de microscopia e reisolamento. Estas análises foram realizadas tanto com a linhagem selvagem de *E. nigrum* (P16) quanto com a linhagem transformada (P16-35gfp) expressando a proteína verde fluorescente (GFP). Além disso, o efeito da inoculação dessas linhagens sobre o crescimento de plantas de cana de açúcar em casa de vegetação também foi investigado.

3.2.1.10.1 Análise da germinação de conídios de *E. nigrum* e colonização de fragmentos foliares de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A germinação de conídios da linhagem P16 sobre fragmentos foliares de cana-de-açúcar foi investigada. Para tanto, folhas de plantas de 4 meses de idade da variedade SP80-1842 cultivadas no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, SP) foram esterilizadas

superficialmente (etanol 70% por 60s; hipoclorito de sódio a 3% (v/v) por 90s; novamente em etanol 70% por 60s e duas lavagens em água esterilizada) e transferidas para placas de Petri (150 x 15 mm) contendo papel filtro umedecido em água destilada esterilizada, formando uma câmara úmida. Aliquotas de 10 µL de uma suspensão de conídios (1×10^5 conídios.mL⁻¹) foram inoculadas na superfície adaxial dos fragmentos foliares. As placas foram incubadas a 28°C com fotoperíodo de 16 horas. Fragmentos de 5 mm foram coletados em intervalos regulares (0h, 6h, 12h, 18h, 24h, 30h, 36h, 42h, 48h e 72h) e fixados em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M). As amostras foram fixadas com tetróxido de ósmio (OsO₄ 1% em tampão cacodilato 0,1M), desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e então submetidas à secagem ao ponto crítico e metalização. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940 A, no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA), ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

3.2.1.10.2 Análise *in vitro* da interação de *E. nigrum* expressando GFP com plantas de cana-de-açúcar por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

A capacidade de *E. nigrum* de colonizar raízes de plantas axênicas *in vitro* foi investigada utilizando as linhagens P16-35gfp (transformada com o gene repórter *gfp*) e P16 (selvagem). A linhagem P16-35gfp foi obtida por transformação mediada por *A. tumefaciens*, conforme descrito anteriormente, e foi escolhida por apresentar estabilidade em meio de cultura não seletivo e morfologia semelhante à linhagem original P16. Além disso, o local de inserção do T-DNA foi identificado para esta linhagem por meio da técnica TAIL-PCR.

O experimento foi realizado com plantas axênicas da variedade SP70-1143 (em F3 do cultivo *in vitro*), gentilmente fornecidas pelo CTC (Piracicaba, SP). Conídios foram inoculados em frascos contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ajustando-se a concentração para 1×10^5 conídios.mL⁻¹. As plantas axênicas foram transferidas para estes frascos de modo que as raízes ficassem imersas no meio líquido contendo conídios. Plantas não inoculadas foram utilizadas como controle. Os frascos foram incubados a 28°C com fotoperíodo de 16 horas e amostras foram coletadas em intervalos regulares (0h, 24h, 48h, 72h e 96h). Fragmentos das raízes, bem como cortes transversais e longitudinais, foram dispostos diretamente sobre lâminas com água esterilizada. Raízes de três plantas foram analisadas para cada tempo de

incubação. As lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência Axiophot-2, como descrito anteriormente.

3.2.1.10.3 Inoculação de *E. nigrum* selvagem e transformante em casa de vegetação e análise da interação por meio de reisolamento

A capacidade de *E. nigrum* de colonizar folhas, raízes e a rizosfera de cana-de-açúcar foi avaliada em casa de vegetação por meio de isolamento. A variedade convencional SP80-1842 foi utilizada neste experimento. Plantas de 30 dias de idade crescidas em bandejas com substrato comercial PlantMax (Eucatex, www.eucatex.com.br) foram gentilmente cedidas pelo CTC (Piracicaba, SP). Dois experimentos foram preparados, um para investigar a colonização de folhas e outro para investigar a colonização das raízes.

3.2.1.10.3.1 Preparo do inóculo e montagem dos experimentos em casa de vegetação

Para inoculação das raízes de cana-de-açúcar, o inóculo foi preparado como segue: 20g de sementes de trigo foram colocadas em frascos e umedecidas com 10 mL de água destilada. As sementes foram esterilizadas em autoclave durante 1 hora, por três vezes consecutivas. Posteriormente, dois discos de micélio de cada linhagem (P16 e P16-35gfp) provenientes de culturas crescidas em BDA (Difco) foram inoculados sobre as sementes e os frascos foram incubados a 28°C durante 15 dias. Em seguida, vasos com capacidade para 1 kg foram preenchidos com substrato comercial PlantMax, rotineiramente utilizado para propagação de cana-de-açúcar no Centro de Tecnologia Canavieira, e as mudas da variedade SP80-1842 foram transferidas para estes vasos, juntamente com 20 g do inóculo preparado anteriormente, de modo que as sementes colonizadas pelo fungo ficassem em contato com as raízes das plantas. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro tratamentos (SP80-1842 não inoculada; SP80-1842 + sementes de trigo; SP80-1842 + P16 e SP80-1842 + P16-35gfp) e três repetições, onde cada planta foi considerada uma repetição.

Para inoculação das folhas de cana-de-açúcar, o inóculo foi preparado da seguinte maneira: três discos de micélio de cada linhagem foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura caldo batata (12 frascos para cada linhagem). Após crescimento durante 15 dias a 28°C, o micélio foi filtrado a vácuo e a massa fresca micelial foi estimada para cada linhagem. Em seguida, o micélio foi misturado com tampão PBS (NaCl 8g;

KCl 0,2g; Na₂HPO₄ 1,4g; KH₂PO₄ 0,24g; 1000 mL água destilada; pH 7,4) na proporção de 70 g.L⁻¹ e esta suspensão foi homogeneizada e transferida para borrifador. Plantas da variedade SP80-1842 foram transferidas para vasos contendo 1 kg de substrato comercial PlantMax e em seguida a suspensão de micélio triturado foi inoculada nas folhas. As plantas foram mantidas em condição de alta umidade em ambiente de casa de vegetação por 48 horas (câmara úmida com sacos plásticos transparentes). O controle consistiu na aplicação de tampão PBS. O delineamento foi o de blocos casualizados, com três tratamentos (SP80-1842 não inoculada; SP80-1842 + P16 e SP80-1842 + P16-35gfp) e três repetições, onde cada planta foi considerada uma repetição.

3.2.1.10.3.2 Reisolamento de *E. nigrum* de plantas de cana-de-açúcar

A interação de *E. nigrum* com cana-de-açúcar foi avaliada por meio de isolamento (20 e 60 dias após a inoculação) da comunidade endofítica de folhas, bainhas e de raiz e também do filoplano e da rizosfera. Os fungos endofíticos de folhas e bainhas foram isolados após desinfecção superficial (etanol 70% por 60s; hipoclorito de sódio a 3% (v/v) por 90s; etanol 70% por 60s e duas lavagens em água esterilizada). Sete fragmentos de 0,5 cm² das amostras foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Difco) acrescido dos antibióticos tetraciclina e penicilina (50 µg.mL⁻¹) para impedir o crescimento de bactérias. Com a finalidade de avaliar a eficiência da desinfecção, uma alíquota de 100 µL da água utilizada na última lavagem foi semeada sobre meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 28°C durante 10 a 15 dias. O número de colônias foi convertido para unidades formadoras de colônia (UFC) por fragmento. Estes dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de significância com auxílio do software SAS (Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Para o isolamento de fungos do filoplano, 10 fragmentos foliares de 5,0 x 1,5 cm² foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo esferas de vidro (0,2 cm de diâmetro) e 50 mL de tampão PBS. Após agitação durante duas horas (200 rpm) a 28°C, alíquotas de 100 µL foram semeadas em meio BDA (Difco) conforme descrito anteriormente e incubadas a 28°C por 7 dias. O número de colônias fúngicas foi convertido para UFC por cm², considerando as faces superiores e inferiores dos fragmentos utilizados. Estes dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância.

Para o isolamento de fungos da rizosfera, o excesso de substrato foi retirado das raízes e estas foram vigorosamente agitadas para que o substrato aderido às mesmas fosse coletado. Amostras de 5 gramas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo esferas de vidro e 50 mL de tampão PBS. Após incubação por uma hora a 28°C sob agitação (200 rpm), diluições apropriadas foram semeadas em meio BDA (Difco) conforme descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias. O número de UFC por grama de substrato foi transformado em $\text{Log}(x + 2)$ e submetido ao teste de Tukey a 5% de significância.

Para o isolamento de fungos endofíticos de raiz, as raízes utilizadas anteriormente foram lavadas em água corrente e uma amostra de 2 g foi submetida ao processo de desinfecção superficial adotado para o isolamento de fungos de folhas, modificando o tempo de imersão em hipoclorito de sódio (180s ao invés de 90s). As amostras foram processadas, incubadas e analisadas conforme descrito para o isolamento de folhas de cana-de-açúcar.

3.2.1.10.3.3 Confirmação da identidade dos reisolados de *E. nigrum*

As colônias morfológicamente semelhantes a *E. nigrum* obtidas nos isolamentos foram comparadas com as linhagens originais (P16 e P16-35gfp) por meio de testes de sensibilidade a higromicina B e por meio de marcadores RAPD. Para tanto, cada reisolado foi crescido em meio de cultura BDA até a conidiação e culturas monoconidiais foram obtidas. Em seguida, a sensibilidade a higromicina B foi avaliada cultivando-se os reisolados em BDA suplementado com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ deste antibiótico. O DNA genômico dos reisolados foi extraído conforme descrito anteriormente e utilizado como molde nas reações de PCR. Os oligonucleotídeos OP-X12, OP-X17 e OP-X19 (Operon Technologies, USA) foram utilizados nas reações de RAPD.

As reações de RAPD foram preparadas em duplicata, em volume final de 25 μL com 0,25 mM de dNTP; 3,0 mM de MgCl_2 ; Tampão 1x (50mM de KCl e 20mM de Tris-HCl - pH 8,4); 0,5 U. μL^{-1} de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil); 0,4 μM de cada iniciador e 5 ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada em termociclador PTC – 200 (MJ Research) programado para desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C, 2 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados sobre luz UV.

3.2.1.10.4 Efeito da inoculação das linhagens selvagem e transformada de *E. nigrum* sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação

O efeito da inoculação de *E. nigrum* sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar foi avaliado. Plantas axênicas em fase de enraizamento da variedade SP70-1143 foram gentilmente cedidas pelo CTC (Piracicaba, SP) e utilizadas neste experimento. Para tanto, foram preparados tubos do tipo Falcon de 50 mL contendo 7 mL de meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Conídios das linhagens P16 e P16-35gfp foram inoculados nestes tubos e a concentração foi ajustada para 1×10^5 conídios.mL⁻¹. Plantas micropropagadas apresentando características homogêneas (mesmo tamanho da parte aérea e número de raízes semelhante no cultivo *in vitro*) foram individualizadas e assepticamente transferidas para os tubos contendo conídios. As plantas foram incubadas a 28°C com fotoperíodo de 16 horas durante três dias e em seguida aclimatizadas em casa de vegetação. Para isso, bandejas de plástico contendo poços com capacidade para 200 mL cada foram preenchidas com substrato comercial PlantMax, rotineiramente usado pelo Centro de Tecnologia Canavieira para propagação de cana-de-açúcar. As mudas foram transplantadas para este substrato e mantidas em câmara úmida (cobertas com sacos plásticos transparentes) em condições de casa de vegetação durante 10 dias.

Após este período, a câmara úmida foi retirada e as plantas foram regadas a cada dois dias com 50 mL de água. Após um período de 60 dias de crescimento em condições de casa de vegetação, as plantas foram coletadas e avaliadas quanto ao acúmulo de massa fresca e seca das raízes e da parte aérea. Para a determinação da massa seca, as plantas foram incubadas em estufa a 80°C por 24 horas e depois a 65°C até que o peso fosse constante. As análises foram realizadas com 10 plantas de cada tratamento (SP70-1143 não inoculada; SP70-1143 + P16 e SP70-1143 + P16-35gfp), em um delineamento inteiramente casualizado, com auxílio do software SAS (Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) onde foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.2.2 Resultados e Discussões

3.2.2.1 Sensibilidade a higromicina B

Com o objetivo de desenvolver um protocolo de transformação eficiente para *E. nigrum*, o presente trabalho investigou a capacidade de *A. tumefaciens* de transferir a região T-DNA para

este fungo, utilizando o gene de resistência a higromicina B (*hph*) como marcador de seleção e o gene *gfp* (proteína verde fluorescente) como repórter. Um pré-requisito para o uso do gene *hph* como marcador de seleção é a sensibilidade da linhagem receptora ao antibiótico higromicina B. Portanto, antes de iniciar os experimentos, a concentração mínima inibitória de higromicina B foi determinada para as linhagens P16 e TH2. Foi observado que 3,125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ deste antibiótico inibiram totalmente o crescimento das linhagens, no entanto, para aumentar a confiabilidade dos resultados, a concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi escolhida para seleção dos transformantes.

3.2.2.2 Transformação de *E. nigrum* mediada por *A. tumefaciens*

Este é o primeiro relato do desenvolvimento de um sistema de transformação para o fungo *E. nigrum*. Utilizando conídios germinados como material inicial, o presente trabalho prontamente obteve colônias resistentes a higromicina B e expressando a proteína verde fluorescente (GFP) após 7 a 20 dias de crescimento em meio de cultura seletivo (Figura 3.2). Transformantes foram obtidos quando acetoseringona estava presente tanto no meio de crescimento das bactérias quanto durante o co-cultivo. Na ausência de acetoseringona, nenhum transformante foi recuperado. Este composto fenólico funciona como um indutor da expressão dos genes de virulência (*vir*) (GELVIN, 2003) e é essencial para a transferência do T-DNA, como tem sido observado para outros fungos (MICHIELSE et al., 2005).

Utilizando a linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* como doadora, o número médio de colônias resistentes (transformantes) variou de 6,0 a 100,4 colônias por 10^5 conídios para a linhagem P16 e 0,2 a 32,6 colônias por 10^5 conídios para a linhagem TH2, em dois experimentos independentes, dependendo das condições de co-cultivo (Figura 3.3). Esta frequência foi superior à reportada para algumas espécies da ordem Pleosporales que têm sido transformadas por esta metodologia. Por exemplo, a eficiência de transformação de *Leptosphaeria maculans* e *L. biglobosa* foi 30–40 e 20–25 transformantes por 10^7 esporos, respectivamente (ECKERT et al., 2005). Para *Coniothyrium minitans*, Rogers et al. (2004) obtiveram 37,8 transformantes resistentes a higromicina B por 5×10^5 conídios, enquanto que Li et al. (2005) relataram um máximo de 77 transformantes resistentes por 2×10^6 conídios desta espécie. No entanto, para *Venturia inaequalis*, Fitzgerald et al. (2003) obtiveram um máximo de 223 transformantes por 200 mg de micélio, enquanto que para *Verticillium fungicola* 4068 transformantes por 10^5 conídios foram obtidos (Amey et al., 2002).

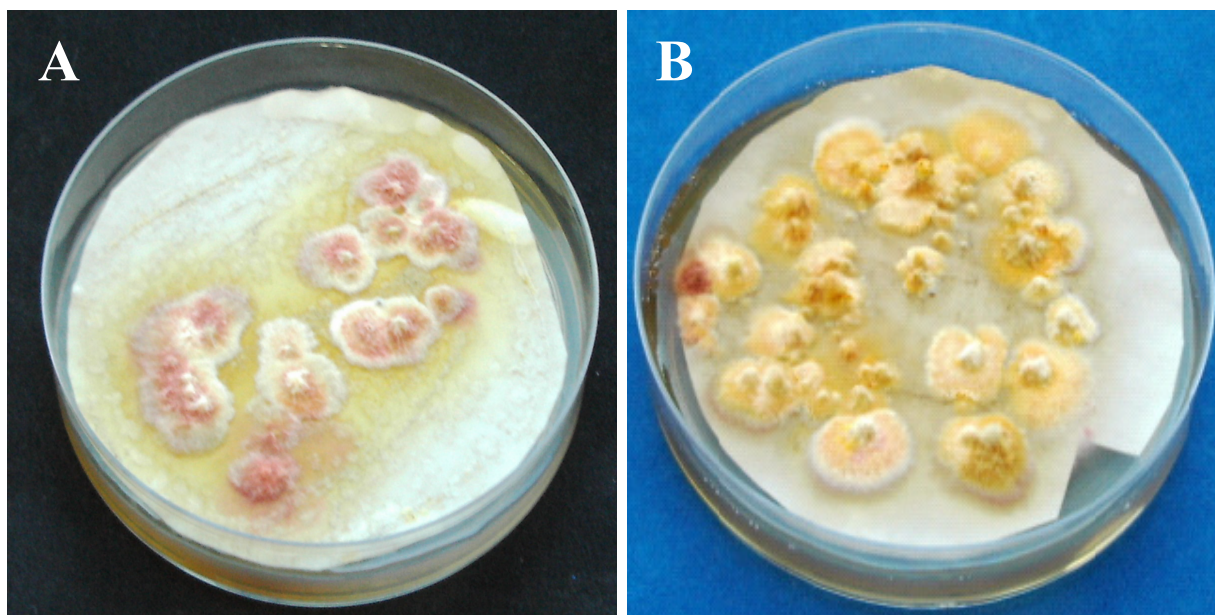


Figura 3.2 – Transformação mediada por *A. tumefaciens* da linhagem P16 de *E. nigrum*, utilizando a linhagem EHA105 como doadora. Aspecto das colônias resistentes a higromicina B crescendo em meio seletivo BDA após 10 dias de crescimento. A) Colônias de *E. nigrum* crescendo sobre meio seletivo com membrana de papel filtro. B) Colônias de *E. nigrum* crescendo sobre meio seletivo com membrana de nylon. Estas membranas foram provenientes de placas de co-cultivo contendo acetoseringona, um indutor da transferência da região T-DNA

3.2.2.3 Adequação das condições de transformação mediada por *A. tumefaciens*

A pré-germinação de conídios é frequentemente utilizada antes do co-cultivo na transformação mediada por *A. tumefaciens* de fungos (ABUODEH et al. 2000; O'CONNELL et al., 2004), para aumentar as chances de infecção das hifas em desenvolvimento. Em avaliação preliminar, a utilização de conídios não germinados resultou em poucos transformantes para a linhagem P16 (dados não mostrados), o que levou a escolha de conídios germinados para realização dos experimentos subsequentes. Após um período de aproximadamente 6 a 8 horas de incubação a maioria dos conídios apresentou tubo germinativo, e este período foi então utilizado nos experimentos de transformação.

O fungo *E. nigrum* possui conídios altamente melanizados (ELLIS; GRIFFITHS, 1974) e de parede espessa, o que pode dificultar a transformação, como também foi demonstrado para *C. minitans* (ROGERS et al., 2004). A utilização de fragmentos miceliais também resultou em setores resistentes a higromicina B para as linhagens P16 e TH2 (dados não mostrados), evidenciando a versatilidade desta metodologia quanto ao tipo de material inicial escolhido para transformação.

Vários parâmetros que podem afetar a eficiência da transformação mediada por *A. tumefaciens* foram avaliados no presente trabalho, entre eles, linhagens de *A. tumefaciens* e dos fungos e condições do co-cultivo. Com a finalidade de adequar as condições de transformação, inicialmente foi realizado um experimento com a linhagem P16 de *E. nigrum* utilizando duas linhagens de *A. tumefaciens* portadoras do vetor pFAT-gfp (EHA105 e LBA4404), juntamente com três parâmetros de co-cultivo (concentração de acetoseringona, tipo de membrana e tempo de co-cultivo). O efeito destes parâmetros sobre a eficiência de transformação é representado na Tabela 3.1. Um aumento expressivo do número de colônias resistentes a higromicina B foi obtido quando a linhagem EHA105 foi utilizada como doadora. O mesmo foi observado quando membranas de nylon foram utilizadas e quando a concentração de acetoseringona e o período de co-cultivo foram aumentados (Tabela 3.1).

3.2.2.3.1 Efeito da linhagem de *A. tumefaciens*

As diferenças da eficiência de transformação obtidas com as linhagens EHA105 e LBA4404 podem estar relacionadas à origem destas linhagens. A linhagem EHA105 deriva da linhagem EHA101, que contém o plasmídeo indutor de tumor hipervirulento pTiBo542A, do qual a região T-DNA foi deletada e substituída pelo gene de resistência a canamicina (HOOD et al., 1986). A deleção desse loco resultou no plasmídeo pTiEHA105 (HOOD et al., 1993) o qual contém os genes *vir* hipervirulentos do tipo succinamopina. Embora a eficiência obtida com a linhagem LBA4404 tenha sido menor, esta linhagem, em combinação com o vetor pFAT-gfp, já tinha sido utilizada com sucesso por Fitzgerald et al. (2003) para transformar fragmentos miceliais de *V. inaequalis*. Diferenças quanto à eficiência de transformação entre linhagens de *A. tumefaciens* são bem conhecidas para plantas e a combinação apropriada de marcador de seleção, vetor binário e linhagem de *A. tumefaciens* é um ponto crítico no processo de transformação (HELLENS; MULLINEAUX; KLEE, 2000). Poucos trabalhos têm avaliado de modo sistemático o efeito de diferentes cepas de *A. tumefaciens* sobre a eficiência de transformação de fungos (BETTS et al., 2007). Semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, linhagens derivadas da linhagem selvagem A281 têm sido mais eficientes que linhagens como LBA1100 (CAMPOY et al., 2003) ou LBA4404 (ABELLO; KELEMU; GARCÍA, 2008). Estes resultados mostram que a escolha da linhagem doadora pode afetar a eficiência de transformação, especialmente quando a obtenção de um grande número de transformantes é desejada.

Tabela 3.1 – Efeito da linhagem de *A. tumefaciens* e de diferentes parâmetros do co-cultivo sobre a eficiência de transformação ^(a) da linhagem P16 de *E. nigrum*

Linhagem de <i>A. tumefaciens</i> ^(b)	Tempo de co-cultivo (horas)	Concentração de AS ^(c) ($\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Tipo de membrana utilizada		
			Papel	Nitrocelulose	Nylon
EHA105 / pFAT-gfp	48 h	200	0,6	0,4	20,8
		400	1,8	0	60,4
	96 h	200	3,8	0	28,2
		400	15,0	0	96,0
LBA4404 / pFAT-gfp	48 h	200	0	0	0
		400	0	0	0
	96 h	200	0	0	2,0
		400	0,4	0	4,6

(a) A eficiência de transformação corresponde ao número médio de transformantes obtido por 1×10^5 conídios germinados da linhagem P16 de *E. nigrum* (média de cinco repetições). (b) Linhagens de *A. tumefaciens* utilizadas como doadoras do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003). (c) Concentração de acetoseringona utilizada nas placas de co-cultivo.

3.2.2.3.2 Efeito de diferentes parâmetros do co-cultivo sobre a eficiência de transformação

O presente trabalho investigou o efeito de diferentes condições de co-cultivo sobre a eficiência de transformação. Como verificado na Tabela 3.1, um aumento expressivo no número de colônias resistentes foi obtido quando membranas de nylon foram empregadas no co-cultivo. Embora membranas de nitrocelulose sejam comumente utilizadas (BUNDOCK et al., 1995; GROOT et al., 1998; LIMA et al., 2006; MATA et al., 2007), poucos transformantes da linhagem P16 foram recuperados com este suporte. O mesmo foi observado com membranas de celofane (dados não mostrados). Com membranas de papel filtro, um número razoável de transformantes foi obtido (Tabela 3.1), o que pode representar uma alternativa de baixo custo para geração de transformantes nessa espécie (Figura 3.2).

O efeito positivo das membranas de nylon também foi relatado para *A. fumigatus* (SUGUI; CHANG; KWON-CHUNG, 2005) e para o oomiceto *Phytophthora infestans* (VIJN; GOVERS, 2003). A transferência da região T-DNA tem sido mostrada como dependente de íntima associação das células bacterianas com conídios (DUARTE et al., 2007) e, desse modo, a presença de um substrato sólido permite que as células receptoras e doadoras cresçam próximas umas das outras. As diferenças observadas entre os tipos de filtro podem estar relacionadas às propriedades químicas das membranas (SUGUI; CHANG; KWON-CHUNG, 2005) e ao diâmetro dos poros, os quais podem afetar a distribuição e associação de células bacterianas e conídios, resultando em um menor número de transformantes.

O efeito da duração do período de co-cultivo também foi investigado. Para muitos fungos, o tempo de 48 horas de co-cultivo é comumente utilizado (GROOT et al., 1998; COVERT et al., 2001; WELD; EADY; RIDGWAY, 2006; ZHONG et al., 2007), no entanto, no presente trabalho a extensão deste período para 96 horas resultou em um maior número de transformantes. Utilizando a linhagem LBA4404 como doadora, colônias resistentes só foram obtidas após 96 horas de co-cultivo (Tabela 3.1). A correlação encontrada neste trabalho entre aumento do período de co-cultivo e aumento do número de transformantes também foi relatada para outros fungos, por exemplo, *F. oxysporum* (MULLINS et al., 2001), *Beauveria bassiana* (LECLERQUE et al., 2004), *Colletotrichum graminicola* (FLOWERS; VAILLANCOURT, 2005), *Cryptococcus neoformans* (MCCLELLAND; CHANG; KWON-CHUNG, 2005), *Magnaporthe oryzae* (BETTS et al., 2007), *C. falcatum* e *C. acutatum* (MARUTHACHALAM et al., 2008).

Um aspecto importante observado nesse experimento inicial foi o efeito da concentração de acetoseringona sobre o número de transformantes recuperado (Tabela 3.1). Utilizando 400 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acetoseringona no co-cultivo, um aumento de 3 a 4 vezes no número de colônias resistentes foi verificado quando a linhagem EHA105 foi utilizada como doadora, independente do tempo de co-cultivo (Tabela 3.1). Este efeito positivo também foi descrito para *C. lagenarium* (TSUJI et al., 2003), *B. bassiana* (FANG et al., 2004; LECLERQUE et al., 2004) e *Ascochyta rabiei* (WHITE; CHEN, 2006).

Para avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos no experimento de otimização (Tabela 3.1), dois experimentos independentes (Figura 3.3) foram realizados utilizando apenas a linhagem EHA105 como doadora, e incluindo a linhagem TH2 de *Epicoccum* sp. Quando membranas de nylon foram utilizadas no co-cultivo foi observado um aumento de até 10 vezes no número de transformantes para as linhagens P16 e TH2, nos dois experimentos independentes (Figura 3.3). A mesma tendência de aumento no número de colônias resistentes das duas linhagens de fungos foi observada quando o tempo de co-cultivo foi estendido de 48 para 96 horas. Esta tendência foi verificada para as duas linhagens no primeiro experimento, mas somente para a linhagem P16 (de *E. nigrum*) no segundo experimento. A falta de consistência entre os dados do primeiro e segundo experimento para a linhagem TH2 (de *Epicoccum* sp.), pode ser devida, em parte, ao uso de conídios provenientes de colônias velhas no segundo experimento, o que pode ter levado a uma diminuição da viabilidade dos conídios. Como pode ser observado na Figura 3.3, o aumento da concentração de acetoseringona no co-cultivo

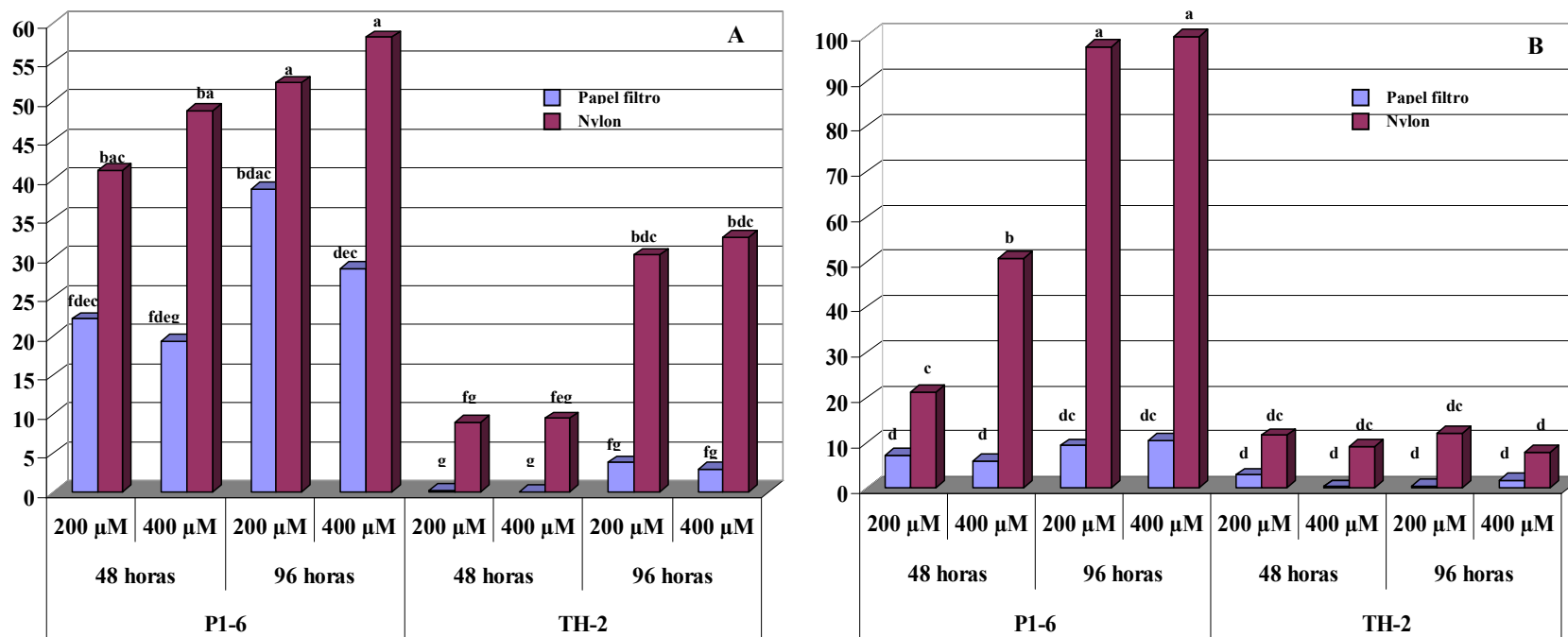


Figura 3.3 – Efeito de diferentes parâmetros do co-cultivo sobre a eficiência de transformação mediada por *A. tumefaciens* de duas linhagens endofíticas de *Epicoccum* de cana-de-açúcar (P16, *E. nigrum* e TH2, *Epicoccum* sp.). A linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* foi utilizada como doadora do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003). A figura representa dois experimentos independentes. (A) Primeiro experimento. (B) Segundo experimento. O eixo Y de cada gráfico representa o número médio de colônias resistentes a higromicina B obtido por 1×10^5 conídios germinados (média de cinco repetições). Cada combinação de parâmetros foi considerada um tratamento distinto, num total de 16 tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Os parâmetros investigados foram: linhagem fúngica (P16 e TH2); tempo de co-cultivo (48 horas e 96 horas); concentração de acetoseringona no co-cultivo ($200 \mu\text{M.mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{M.mL}^{-1}$) e tipo de membrana utilizada no co-cultivo (papel filtro e nylon)

nem sempre resultou em um aumento no número de transformantes. Este aumento só foi significativo no período de 48 horas de co-cultivo. Além disso, este efeito não foi observado quando membranas de papel filtro foram utilizadas no co-cultivo, ao contrário, a utilização deste tipo de suporte resultou em uma diminuição no número de transformantes recuperados. Com base nos resultados obtidos, diferenças significativas foram encontradas entre as linhagens P16 e TH2 quanto ao número de colônias resistentes a higromicina B. As duas linhagens utilizadas neste trabalho foram recentemente separadas em espécies distintas com base em análises morfológicas, fisiológicas e moleculares (capítulo 2) e podem apresentar diferenças quanto à susceptibilidade à infecção por *A. tumefaciens*. A diferença entre linhagens de fungos observada neste estudo também foi relatada para outras espécies como *F. circinatum* (COVERT et al., 2001) e *V. inaequalis* (FITZGERALD et al., 2003).

No presente trabalho, a alteração de diferentes parâmetros de co-cultivo, resultou em uma adequação da metodologia de transformação para obtenção de um número máximo de transformantes. De acordo com os resultados obtidos, diferentes linhagens podem requerer diferentes combinações de parâmetros de co-cultivo, o que pode ser devido a diferenças quanto à taxa de crescimento ou suscetibilidade à infecção por *A. tumefaciens* (MICHELSE et al., 2005). Além disso, a determinação das melhores condições de transformação para uma determinada linhagem fúngica, como a realizada no presente trabalho, é importante, por exemplo, para a realização de experimentos de mutagênese insercional, onde é desejado obter um grande número de transformantes em curto espaço de tempo e com baixo custo.

A elevada frequência de transformação obtida no presente trabalho demonstra a aplicabilidade desta metodologia para geração de transformantes *E. nigrum* de maneira simples e rápida, possibilitando o uso desta estratégia em experimentos de mutagênese insercional aleatória. *E. nigrum* apresenta grande potencial biotecnológico, tanto para a produção de metabólitos secundários quanto para o controle de fitopatógenos, e o sistema de transformação desenvolvido neste trabalho pode ser utilizado para descoberta de genes envolvidos nestes processos.

3.2.2.4 Análise dos transformantes quanto à estabilidade mitótica e expressão de GFP

Um dos objetivos deste trabalho foi obter linhagens transformadas expressando GFP de maneira estável, para investigar a interação com plantas de cana-de-açúcar. Após 10 passagens

sucessivas em meio não seletivo (ausência de higromicina B), conídios provenientes das colônias da última passagem foram semeados em meio de cultura contendo $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de higromicina B. Os resultados mostraram que 93,06% dos transformantes da linhagem P16 e 96,1% dos transformantes da linhagem TH2 mantiveram a capacidade de crescer na presença de higromicina B após sucessivas repicagens na ausência deste antibiótico. A estabilidade do T-DNA durante a divisão mitótica das duas linhagens é consistente com a integração no DNA cromossômico e também semelhante à porcentagem de estabilidade encontrada para outros fungos (DUARTE et al., 2007; WANG; LI, 2008).

Um aspecto importante a ser considerado é a natureza multicelular dos conídios de *E. nigrum*, embora estes núcleos se originem de um único núcleo da célula conidiogênica por meio de mitose (MIMS; RICHARDSON, 2005). Nos testes de germinação, foi possível observar mais de um tubo germinativo por conídio. Durante a transformação, se as células de *A. tumefaciens* interagem aleatoriamente com os conídios germinados, existe a possibilidade de que a infecção ocorra em mais de um tubo germinativo de um mesmo conídio (ou em mais de uma célula de um mesmo conídio) e que a colônia resultante seja uma mistura de transformantes, ou uma mistura de células transformadas e não transformadas.

No entanto, como cada núcleo do conídio multicelular é herdado por mitose, se culturas monospóricas (monoconidiais) forem obtidas, a probabilidade de que a nova colônia originada de um único conídio seja monocariótica é grande, ou seja, o transformante purificado desta maneira apresentará núcleos transformados idênticos. Desse modo, antes de iniciar os testes de estabilidade e as análises moleculares e de microscopia, os transformantes obtidos das placas de seleção foram cultivados na presença de higromicina B até a conidiação. Culturas monospóricas foram então obtidas para todos os transformantes, na presença de higromicina B. Esta nova colônia resistente foi utilizada como inóculo inicial nos testes de estabilidade e nas análises posteriores.

Transformantes escolhidos aleatoriamente das linhagens P16 e TH2 foram analisados por microscopia óptica de epifluorescência (Figura 3.4). A emissão de fluorescência foi observada tanto nas hifas quanto nos conídios de todos os transformantes avaliados, mesmo após sucessivas repicagens em meio de cultura sem higromicina B, evidenciando a estabilidade destas linhagens. Não foi detectada fluorescência nas hifas e conídios das linhagens selvagens. Nesta análise, a expressão de GFP foi intensa nos conídios, especialmente no citoplasma destes, com os septos

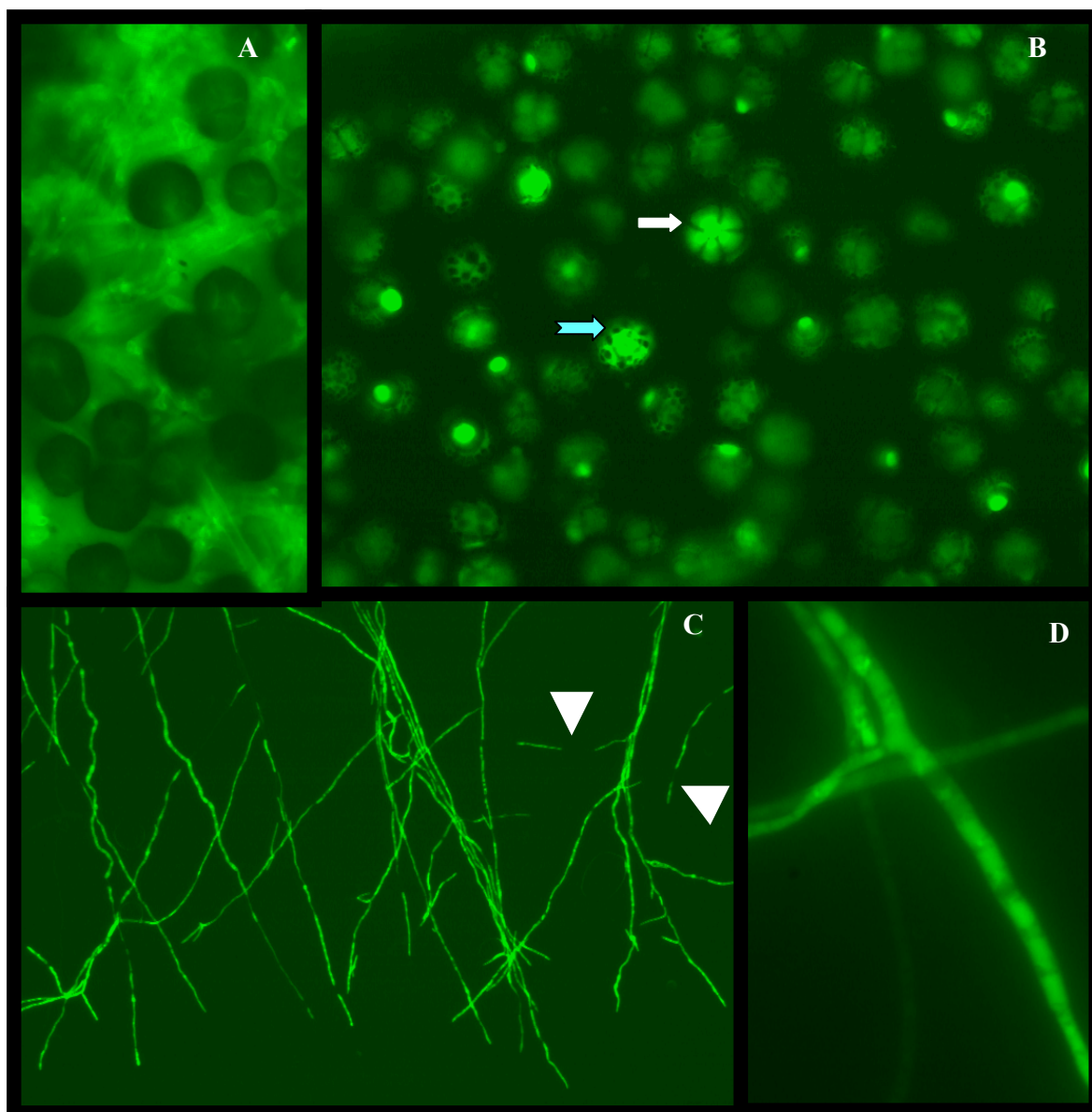


Figura 3.4 – Análise de microscopia de epifluorescência de transformantes da linhagem P16 de *E. nigrum*. (A) Conídios da linhagem selvagem P16 de *E. nigrum* não emitem fluorescência quando excitados com ultravioleta (aumento de 400X). (B) Conídios da linhagem transformada P16-35gfp emitem fluorescência sob luz UV; a seta branca aponta um conídio onde é possível notar os septos sem fluorescência, em meio ao citoplasma fluorescente; a seta azul demonstra regiões de acúmulo de melanina na superfície dos conídios, que aparecem como regiões escuras sem fluorescência (aumento de 400X). (C) Micélio da linhagem transformada P16-35gfp, após 5 dias de crescimento em meio de cultura BDA acrescido de higromicina B; as setas brancas apontam segmentos de hifas sem fluorescência ou com fluorescência reduzida, em meio ao micélio altamente fluorescente (aumento de 100X). (D) Detalhe de segmento de hifa fluorescente da linhagem P16-35gfp; note o acúmulo de regiões fluorescentes ao longo do citoplasma (aumento de 630X)

característicos dos conídios de *E. nigrum* aparecendo como regiões escuras não fluorescentes em meio ao citoplasma fluorescente (Figura 3.4B). Em alguns conídios foi possível visualizar regiões

altamente melanizadas que apareceram como pontos escuros na superfície dos conídios (Figura 3.4B). A expressão de GFP foi distribuída ao longo das hifas, especialmente nas extremidades em crescimento ativo, e também ao longo do citoplasma, onde foi possível visualizar um acúmulo em regiões específicas, provavelmente representando núcleos (Figura 3.4D), como demonstrado para outros fungos (FERNÁNDEZ-ÁBALOS et al., 1998; RODRÍGUEZ-TOVAR et al., 2005; MÜLLER et al., 2006). O acúmulo de GFP livre no núcleo é comum em organismos eucariotos, devido ao pequeno tamanho desta proteína, o qual está abaixo do tamanho de exclusão para transporte passivo através do complexo de poro nuclear (FABRE; HURT, 1994).

Ocasionalmente foi possível observar segmentos de hifas com expressão reduzida ou sem expressão de GFP (Figura 3.4C). Resultados similares foram encontrados em *L. maculans* (ECKERT et al., 2005) onde a análise por microscopia de luz dos segmentos de hifas sem expressão revelou que estas regiões apresentavam células colapsadas em hifas mais velhas. A distribuição não uniforme de fluorescência nas hifas de algumas espécies de fungos tem sido relacionada à exclusão de GFP dos vacúolos e mitocôndrias, com acúmulo abundante desta proteína nos núcleos e citoplasma (FERNÁNDEZ-ÁBALOS et al., 1998). Grunewaldt-Stöcker, Riediger e Dietrich (2007) utilizaram microscopia de varredura confocal a laser (CLSM) e descreveram vacuolização pronunciada em hifas jovens de transformantes expressando GFP do fungo endofítico *A. strictum*, em comparação a linhagem não transformada. O mesmo foi observado em *V. dahliae* (EYNCK et al. 2007). Os autores salientaram que os vacúolos funcionam como compartimentos tanto para armazenamento de recursos quanto para detoxificação de compostos, e que o aumento da vacuolização nas hifas poderia ser uma resposta a estresse, sugerindo que tais alterações poderiam estar relacionadas à expressão de GFP. No entanto, não foram realizados experimentos que comprovem esta hipótese.

3.2.2.5 Confirmação da transformação por PCR e análise de *Southern Blot*

A transformação foi confirmada pela amplificação de um fragmento de 750 pb correspondente ao gene *gfp* (Figura 3.5) e de aproximadamente 600 pb, correspondente ao gene *hph* (dados não mostrados), a partir do DNA genômico dos transformantes. Nenhum produto de amplificação foi obtido para as linhagens selvagens P16 e TH2. A extração de DNA diretamente dos conídios e a posterior amplificação por PCR representa uma abordagem útil para confirmação rápida da transformação, sem a necessidade de manipulação de reagentes tóxicos como fenol.

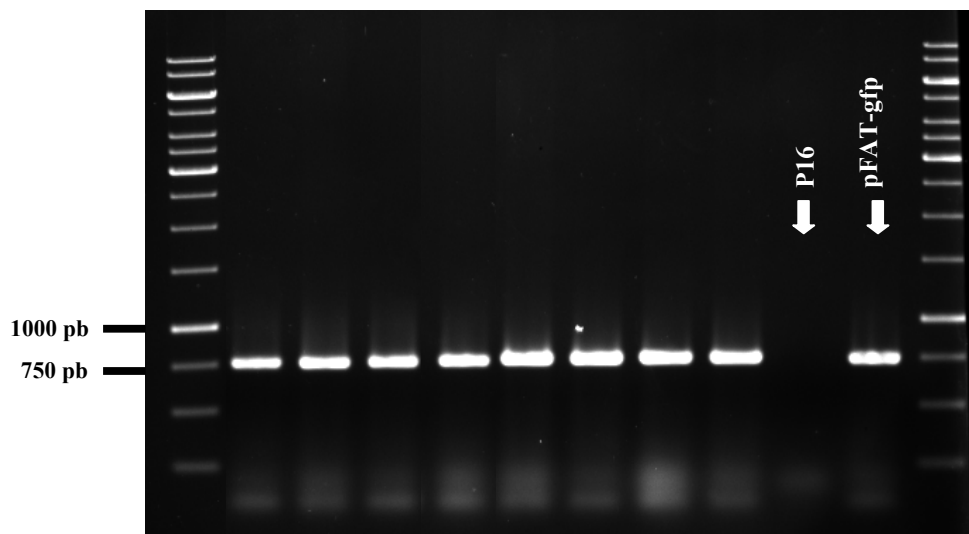


Figura 3.5 – Amplificação do gene *gfp* com os primers glGFP5 e glGFP3 (FITZGERALD et al., 2003) a partir do DNA extraído diretamente dos conídios de 8 transformantes da linhagem P16 de *E. nigrum*. O DNA do vetor pFAT-*gfp* foi utilizado como controle positivo. Não houve amplificação a partir do DNA genômico da linhagem selvagem P16. O marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil) está posicionado nas laterais do gel de agarose. A ordem dos transformantes, da esquerda para direita é: P16-35, P16-73, P16-49, P16-13, P16-150, P16-20 e P16-22

A determinação do número de cópias do T-DNA foi avaliada por *Southern blot*, utilizando um fragmento de 600 pb do gene *hph* como sonda. A região T-DNA do vetor pFAT-*gfp* apresenta dois sítios de reconhecimento para enzima *EcoRI*, utilizada para clivagem do DNA genômico, sendo que um deles ocorre dentro da seqüência do gene *hph*, o que gera um fragmento de 1612 pb para todos os transformantes e para o vetor pFAT-*gfp*. Este fragmento aparece como um sinal de maior intensidade na hibridização, pois apresenta a maior parte do gene *hph* (FITZGERALD et al, 2003). Desse modo, o aparecimento de dois sinais de hibridização corresponde à inserção de uma cópia do T-DNA no genoma, e o tamanho dos fragmentos hibridizados dependerá da distância entre o sítio de corte de *EcoRI* no T-DNA e o próximo sítio na seqüência flanqueadora do genoma do fungo.

De 10 transformantes avaliados, oito apresentaram inserções únicas do T-DNA, e dois apresentaram duas cópias do T-DNA. A Figura 3.6 mostra 4 destes transformantes. Nenhum sinal de hibridização foi observado para a linhagem selvagem P16. A diferença dos tamanhos dos fragmentos hibridizados indica que a integração do T-DNA ocorreu em loci distintos no genoma dos transformantes. Além disso, a presença de sinais de hibridização em fragmentos de alto peso molecular é consistente com a integração cromossômica do T-DNA. A análise por *Southern blot*

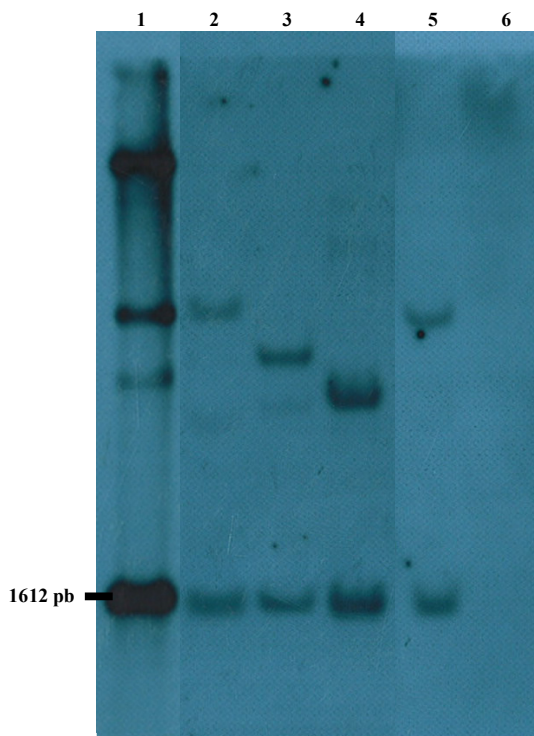


Figura 3.6 – Hibridização de *Southern blot* de 4 transformantes da linhagem P16 de *E. nigrum*. 10-15 μ g de DNA genômico foram clivados com *EcoRI*, transferidos para membranas de nylon e sondados com um fragmento de 600 pb do gene *hph*. A enzima *EcoRI* cliva duas vezes a região T-DNA (uma vez dentro da região de 600 pb usada como sonda). A clivagem do T-DNA em dois sítios gera uma banda de 1612 pb indicada no DNA do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003) e nos transformantes. Esta banda pode apresentar maior intensidade, pois contém a maior parte do gene *hph*, comparada às bandas de tamanho variável. A presença de bandas de tamanhos diferentes mostra integração aleatória, e duas bandas confirmam uma integração única. (1) Vetor pFAT-gfp. (2-5) Transformantes P16-23, P16-110, P16-230, P16-73, respectivamente. (6) Linhagem selvagem P16 de *E. nigrum*

e a comparação das condições em que os transformantes foram obtidos (diferentes linhagens de *A. tumefaciens* e parâmetros de co-cultivo), não revelaram correlação entre origem do transformante e número de cópias inseridas do T-DNA. A elevada frequência de transformantes de *E. nigrum* apresentando cópia única do T-DNA (80%) integrada de maneira aleatória no genoma é consistente com os resultados obtidos para várias espécies de fungos que têm sido transformadas por *A. tumefaciens* (MICHIELSE et al., 2005; WALTON; IDNURM; HEITMAN, 2005; JEON et al., 2007; BLAISE et al., 2007; HUSER et al., 2009). A integração de cópia única é importante para identificação de genes interrompidos pelo T-DNA. Desse modo, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a transformação mediada por *A. tumefaciens* pode ser utilizada como uma ferramenta para mutagênese insercional aleatória de *E. nigrum*, e que as regiões genômicas interrompidas pelo T-DNA podem ser clonadas e identificadas.

3.2.2.6 Análise das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA

O presente trabalho avaliou a aplicação da técnica TAIL-PCR (LIU et al., 1995) para identificar as regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA no genoma dos transformantes. Ao todo, foram avaliados 28 transformantes da linhagem P16 de *E. nigrum*. Antes de iniciar as reações de TAIL-PCR, os transformantes foram avaliados quanto à presença do gene *hph*, por meio da amplificação com os primers *hph1* e *hph2*, sendo que todas as linhagens foram positivas para a presença deste gene. As reações de TAIL-PCR foram consideradas positivas quando a reação terciária produziu um ou mais fragmentos do tamanho esperado, com base na posição de anelamento dos primers específicos para as bordas do T-DNA.

Utilizando os primers específicos para a borda esquerda (LB) do vetor pFAT-gfp construídos neste trabalho, em combinação com os primers arbitrários AD1, AD2 e AD3 (LIU et al., 1995), foi possível obter produtos de amplificação únicos para 75% dos transformantes da linhagem P16, a maioria deles (27 transformantes) sendo obtida com o primer AD2, e apenas um transformante com o primer AD1. Em relação à borda direita (RB), nenhum produto de amplificação foi recuperado na reação terciária. O tamanho dos produtos de amplificação variou de 200 a 1500 pb, e devido ao arranjo em “*nested*” da posição de anelamento dos primers específicos da região T-DNA, foi possível verificar uma diminuição do tamanho dos produtos de PCR, principalmente entre os produtos das reações secundária e terciária (Figura 3.7).

A eficiência de amplificação obtida por TAIL-PCR neste trabalho foi superior à verificada em outros fungos, por exemplo, em *L. maculans*, onde o primer arbitrário AD2 também foi mais eficiente que os demais primers (AD1 e AD3), 45% dos transformantes avaliados apresentaram produtos de amplificação únicos (BLAISE et al., 2007). Já em *F. oxysporum*, a eficiência de amplificação por TAIL-PCR foi de 90% (MULLINS et al., 2001). No presente trabalho, não foi possível recuperar as regiões que flanqueiam a borda direita (RB) do T-DNA. A baixa frequência de recuperação desta região também tem sido relatada para outros fungos (ROLLAND et al., 2003; COMBIER et al., 2003; BLAISE et al., 2007; HUSER et al., 2009).

Um aspecto importante da técnica TAIL-PCR é que se as seqüências das bordas tornam-se truncadas além dos sítios de anelamento dos primers específicos, não será possível recuperar os produtos desejados (MULLINS et al., 2001). A ineficácia da amplificação da borda direita verificada neste trabalho pode ser devida à incompatibilidade dos primers construídos, à inserção de repetições invertidas em tandem (RB para RB) ou ao truncamento desta região antes do sítio

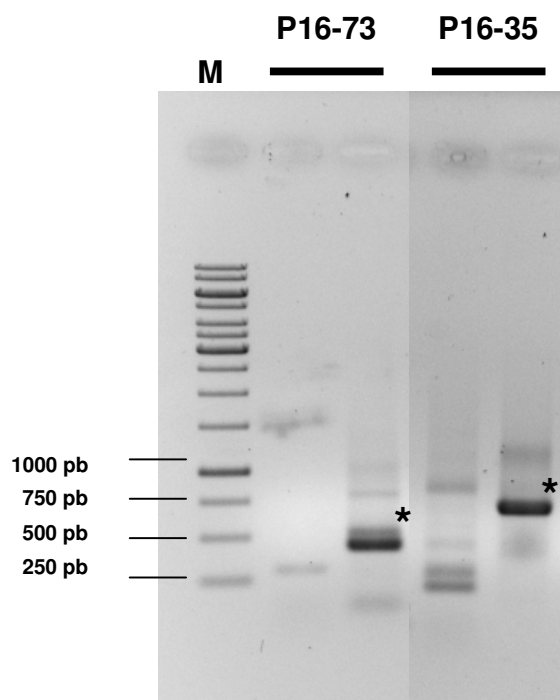


Figura 3.7 – Análise em gel de agarose dos produtos gerados por TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction) a partir de 2 transformantes representativos da linhagem P16 de *E. nigrum*. A amplificação destes transformantes foi realizada com os primers específicos da borda esquerda do T-DNA do vetor pFAT-gfp (LB1-1, LB2-2 e LB3-1) e com o primer arbitrário degenerado AD2. A figura representa, para cada transformante (da esquerda para direita), os produtos das reações secundária e terciária do protocolo. Os produtos de amplificação que representam as junções do T-DNA com o genoma do fungo estão marcados com asteriscos, nas colunas correspondentes à reação terciária de TAIL-PCR. É possível visualizar as diferenças de tamanho entre os produtos das reações secundária e terciária, com base na posição de anelamento dos primers específicos. (M) Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil)

de anelamento dos primers durante a integração no genoma, o que pode interferir com o processo de TAIL-PCR. A construção de novos primers específicos posicionados mais internamente na região RB ou a utilização de outras abordagens, como por exemplo, iPCR (PCR inverso) podem ser úteis para recuperar as seqüências destes transformantes (JEON et al., 2007; WHITE; CHEN, 2006).

A análise das seqüências que flanqueiam a borda esquerda (LB) do T-DNA foi realizada para 8 transformantes da linhagem P16. Em seis destes transformantes foi possível recuperar a seqüência intacta da borda esquerda, no entanto, a seqüência que flanqueia esta região correspondeu a seqüência do próprio plasmídeo pFAT-gfp, mostrando que nestas linhagens a inserção não foi somente do T-DNA, mas também do vetor binário. Para estes transformantes não foi possível determinar as seqüências fúngicas que flanqueiam a região LB por que a seqüência

integrada do vetor binário ultrapassou 600 pb de tamanho. No transformante P16-73 foi possível observar que a borda esquerda teve a seqüência truncada, enquanto que para o transformante P16-35, a seqüência da borda esquerda foi completamente perdida.

Embora apenas 10 transformantes tenham sido avaliados, a elevada freqüência de integração de DNA plasmidial já foi relatada para outros fungos como *C. lagenarium*, onde as seqüências do vetor binário foram encontradas em 43% das seqüências analisadas (TSUJI et al., 2003), em *C. graminicola*, onde 70% dos transformantes apresentaram integrações em tandem de todo o plasmídio Ti (FLOWERS; VAILLANCOURT 2005), e também em *Trichoderma reesei* (ZHONG et al., 2007) e *Botrytis cinerea* (ROLLAND et al., 2003). A recuperação de seqüências do vetor binário adjacentes à borda esquerda do T-DNA indica a ocorrência de uma falha na clivagem desta região quando a transferência foi iniciada. Durante a transformação mediada por *A. tumefaciens* a transferência do DNA inicia na borda direita e termina na borda esquerda, resultando na transferência de todo o DNA localizado entre estas bordas (GELVIN, 2003). Entretanto, muitas vezes a transferência pode continuar para além da borda esquerda, fato já demonstrado em plantas (VAN DER GRAAFF; DEN DULK-RAS; HOOYKAAS, 1996; KIM et al., 2003) e fungos (MENG et al., 2007), onde tem sido atribuído a uma falha do complexo protéico VirD1/VirD2 em clivar a região da borda esquerda do T-DNA.

Para a seqüência de DNA identificada dos transformantes P16-73 e P16-35 foi encontrada de baixa a elevada identidade com seqüências de proteínas depositadas no GenBank. Utilizando a ferramenta BlastX, o transformante P16-35 apresentou similaridade (E value = $3e^{-11}$; identidade = 68%) com uma proteína hipotética BC1G_09451 de *Botryotinia fuckeliana* B05.10 e de vários fungos onde o genoma tem sido anotado, a qual contém um domínio conservado da superfamília GNAT (N-acetiltransferases relacionadas à GCN5; cl00443). Esta superfamília representa diversas enzimas que catalizam a transferência de um grupo acetil da acetil-coenzima A para um grupo amina de uma ampla gama de substratos aceptores. Membros desta superfamília incluem aminoglicosídeo N-acetiltransferase, serotonina N-acetiltransferase, glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferase, histona acetiltransferase, micotiol sintetase, e a família Fem de aminoaciltransferases (DYDA; KLEIN; HICKMAN, 2000; VETTING et al., 2005).

O transformante P16-73 apresentou baixa identidade com uma proteína hipotética BC1G_10049 de *Botryotinia fuckeliana* B05.10 (E value = 8,4; identidade = 25%) que contém um domínio conservado da família de cisteína hidrolases (cd00431). Esta família contém

amidohidrolases semelhantes à N-carbamoylsarcosina amidohidrolase, envolvidas no metabolismo de creatina, e também nicotinamidase, a qual converte nicotinamida a ácido nicotínico e amônia no ciclo de nucleotídeos do tipo piridina. Esta família também representa a enzima isocorismatase, a qual cataliza a conversão de isocorismato a 2,3-dihidroxibenzoato e piruvato, por meio de hidrólise da ligação vinil éter, e outras enzimas relacionadas com função desconhecida (DU et al., 2001).

Estes dois transformantes foram caracterizados na busca de um fenótipo associado aos genes interrompidos. Em comparação a linhagem selvagem P16, o transformante P16-35 não apresentou diferenças significativas quanto à morfologia da colônia e conidiação. Entretanto, o transformante P16-73 perdeu a coloração alaranjada típica de *E. nigrum*, apresentando micélio de coloração entre creme e rosa claro, com aspecto altamente hidrofílico e taxa de crescimento significativamente reduzida em meio de cultura BDA (dados não mostrados), além de apresentar uma cópia do T-DNA, como verificado pela análise de *Southern blot* (Figura 3.6). Estes resultados demonstram que a transformação mediada por *A. tumefaciens* é uma ferramenta útil para mutagênese insercional de *E. nigrum*, e que a metodologia otimizada desenvolvida neste trabalho pode ser utilizada para identificação de genes envolvidos em diferentes processos metabólicos neste fungo endofítico.

3.2.2.7 Interação de *E. nigrum* com cana-de-açúcar: análise por microscopia

Além de desenvolver uma metodologia de transformação para *E. nigrum*, foi também analisada a interação de *E. nigrum* com plantas de cana-de-açúcar. A capacidade da linhagem P16 de germinar sobre e colonizar fragmentos foliares foi investigada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). *E. nigrum* tem sido relatado como membro da comunidade endofítica de diversas espécies de plantas, inclusive cana-de-açúcar (ROMÃO; ARAÚJO, 2007), sendo comumente isolado em alta frequência (FISHER; PETRINI, 1992; LARRAN et al., 2007). Entretanto, o processo de colonização e estabelecimento da interação endofítica com a planta hospedeira não é conhecido.

A análise de microscopia de varredura revelou que conídios da linhagem selvagem P16 iniciaram a germinação 12-16 horas após a inoculação. Eventualmente foi possível observar penetração das hifas em aberturas naturais como estômatos (Figura 3.8a-c). Não foi possível verificar penetração direta na superfície das folhas, ou o desenvolvimento de estruturas

semelhantes à apressório, nem alterações da superfície do hospedeiro nos locais de contato com os conídios e hifas. Com 40 horas de incubação foi possível observar a ramificação das hifas, as quais colonizaram a superfície de maneira aleatória, mas firmemente aderidas à cutícula (Figura 3.8d). Após 64 horas de incubação, a superfície das folhas foi completamente tomada pelas hifas de *E. nigrum* (Figura 3.8e).

Em um dos poucos estudos de microscopia sobre a interação de *E. nigrum* com plantas, Zhou e Reeleder (1991) investigaram a capacidade de biocontrole de *E. nigrum* contra *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijão. Estes autores avaliaram a taxa de germinação de *E. nigrum* sobre fragmentos de pétalas e discos foliares e verificaram germinação após 4 horas de incubação em câmara úmida. Semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, não foi observada penetração direta da superfície foliar, nem alterações no conteúdo de clorofila das folhas colonizadas em comparação as não colonizadas, sugerindo que *E. nigrum* pode ser utilizado no controle biológico deste patógeno.

Embora realizada com fragmentos foliares, situação que pode impedir a reação das células do hospedeiro à colonização pelo fungo, esta análise sugere que *E. nigrum* é capaz de colonizar o filoplano de folhas saudáveis, e eventualmente ocupar as câmaras subestomáticas. Outras análises são necessárias, por exemplo, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, para verificar se a colonização dos tecidos internos ocorre ou se é restrita aos espaços intercelulares da epiderme. Em recente análise da capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas por isolados endofíticos de *E. nigrum* (capítulo 2), foi observada elevada produção de lipases pelas linhagens, inclusive a linhagem P16 estudada neste trabalho. O padrão de colonização observado, com hifas crescendo aderidas à epiderme e a elevada capacidade de secreção de lipases, sugere que a epiderme das folhas constitui um nicho preferencial para este fungo.

Entre os fungos reportados como endófitos por vários autores, muitos são espécies epifíticas que pertencem a gêneros ubíquos capazes de viver dentro dos tecidos vegetais (SADAKA; PONGE, 2003; SCHULZ; BOYLE, 2005). Fisher e Petrini (1992) sugeriram que as comunidades endofíticas frequentemente contêm uma variedade de espécies classicamente epifíticas, incluindo *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* e *E. nigrum*, os quais penetram de forma facultativa nos tecidos foliares da planta hospedeira. Arnold (2007) salientou que o comportamento destes fungos, juntamente com a formação de infecção subcuticular, mas não verdadeiramente endofítica, faz com que persistam mesmo quando métodos de esterilização

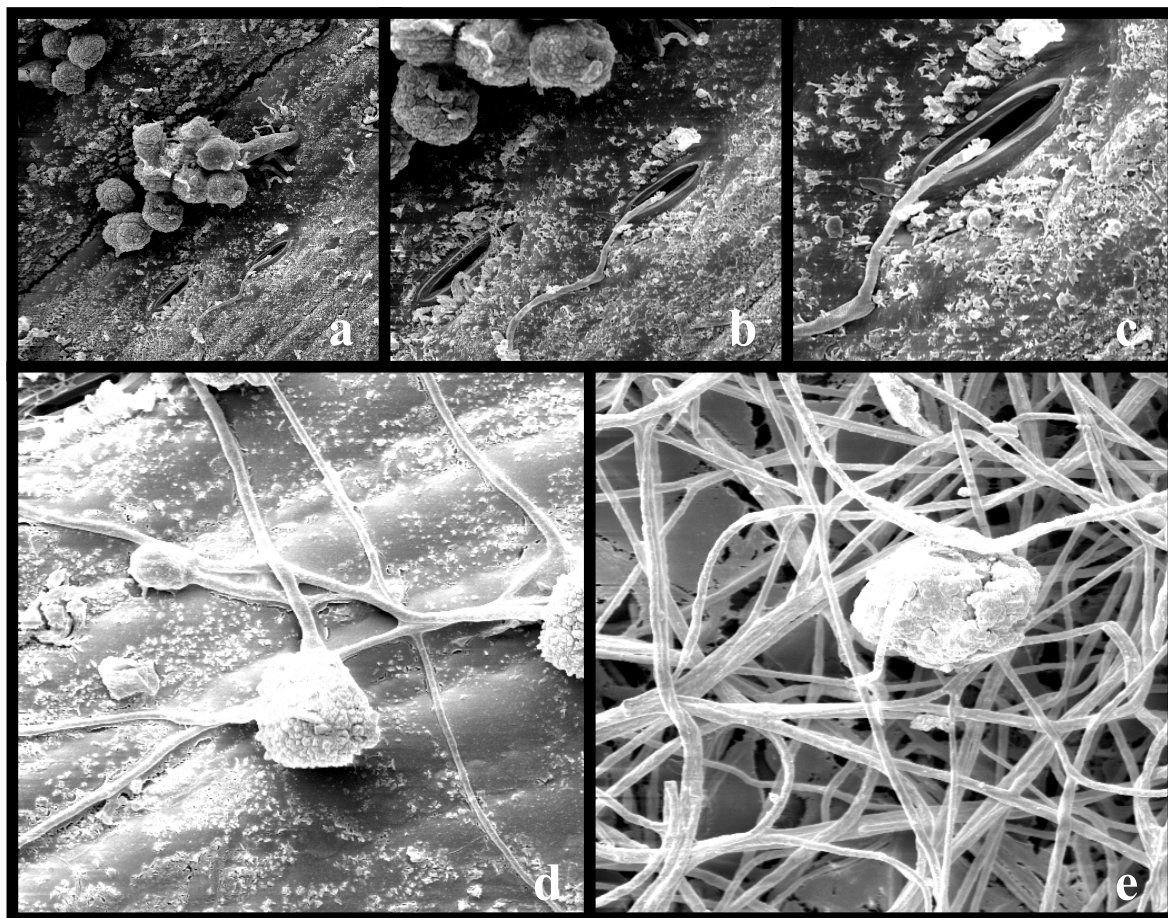


Figura 3.8 – Análise por microscopia eletrônica de varredura da colonização de folhas da variedade SP80-1842 de cana-de-açúcar por conídios da linhagem P16 de *E. nigrum*. (a-c) Aspecto dos conídios após 12 horas de incubação; é possível visualizar a extremidade de uma hifa nas proximidades de um estômato (aumento de 500X, 1000X e 2000X, respectivamente). (d) Aspecto da superfície foliar após 40 horas de incubação; é possível visualizar a ramificação aleatória das hifas (aumento de 1000X). (e) Rede micelial formada na superfície foliar após 64 horas de incubação (1000X)

são utilizados para o isolamento de endófitos. No entanto, análises de microscopia ainda não tinham sido realizadas para comprovar estas hipóteses, e os resultados obtidos no presente trabalho fornecem evidência para este comportamento em *E. nigrum*.

Além do estudo da colonização de folhas, o presente trabalho desenvolveu um método de reintrodução de uma linhagem geneticamente modificada em plantas de axênicas de cana-de-açúcar, e investigou a capacidade de colonização de raízes *in vitro*. Para tanto, foi utilizada a linhagem P16-35gfp transformada com o gene de resistência a higromicina B e com o gene repórter *gfp*. Esta linhagem foi escolhida por se manter estável após sucessivas repicagens em meio não seletivo e por apresentar morfologia semelhante à linhagem selvagem P16. Além disso, o local de inserção do T-DNA foi previamente identificado para esta linhagem por TAIL-PCR e

corresponde a um gene codificador de uma proteína putativa da superfamília GNAT (N-acetiltransferases relacionadas à GCN5; cl00443), conforme discutido anteriormente.

Por meio da análise de microscopia de fluorescência (MOF) foi possível observar que os conídios da linhagem P16-35gfp aderiram às raízes de cana-de-açúcar e que a germinação iniciou após 12-18 horas de incubação. Mesmo com a fluorescência natural dos tecidos radiculares (Figura 3.9c), foi possível visualizar, após 48 horas de incubação, o início da formação de uma rede de hifas fluorescentes ao redor das raízes (Figura 3.9d) e com 72 horas a colonização foi extensa, mas somente na superfície (Figura 3.9e, h, i). Com 96 horas de incubação (Figura 3.9f, g), não foi possível visualizar colonização interna dos tecidos, como demonstrado pela análise de cortes transversais e longitudinais das raízes colonizadas. Não foi possível observar emissão de fluorescência pelo fungo nas raízes colonizadas pela linhagem selvagem P16.

Com 72 horas e 96 horas de incubação, foi possível observar, a vista desarmada, a formação de uma película de micélio ao redor das raízes (dados não mostrados). Além disso, não foi detectada alteração no aspecto geral das plantas colonizadas com a linhagem transformada P16-35gfp ou com a linhagem selvagem P16 em relação às plantas não colonizadas, mesmo após 10 dias de cultivo *in vitro* (dados não mostrados). Estes resultados evidenciam o caráter não patogênico das linhagens utilizadas e que a modificação genética do transformante não afetou a capacidade de colonização superficial *in vitro* das raízes. O caráter não patogênico de *E. nigrum* também foi demonstrado quando linhagens endofíticas foram reintroduzidas em plantas de pupunha cultivadas *in vitro* (ALMEIDA et al., 2005).

Estes resultados reforçam a utilidade da GFP como repórter no estudo da interação endófito planta, como tem sido demonstrado para os fungos endofíticos biotróficos (MIKKELSEN et al., 2001; TANAKA et al., 2006). Este trabalho também demonstrou que uma espécie conhecida como habitante do filoplano também é capaz de colonizar raízes *in vitro* sem indução de sintomas. Estes estudos iniciais de colonização são importantes, principalmente pela possibilidade de modificar geneticamente fungos endofíticos e reintroduzi-los na planta hospedeira (MURRAY; LATCH; SCOTT, 1992; PEREIRA; CARNEIRO-VIEIRA; AZEVEDO, 1999; PANACCIONE et al., 2001; ABELLO; KELEMU; GARCÍA, 2008). Muitas plantas que são propagadas por cultura de tecidos podem apresentar microrganismos benéficos que são excluídos juntamente com os potenciais patógenos, como é o caso da cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2009). Experimentos de reintrodução de fungos endofíticos são importantes,

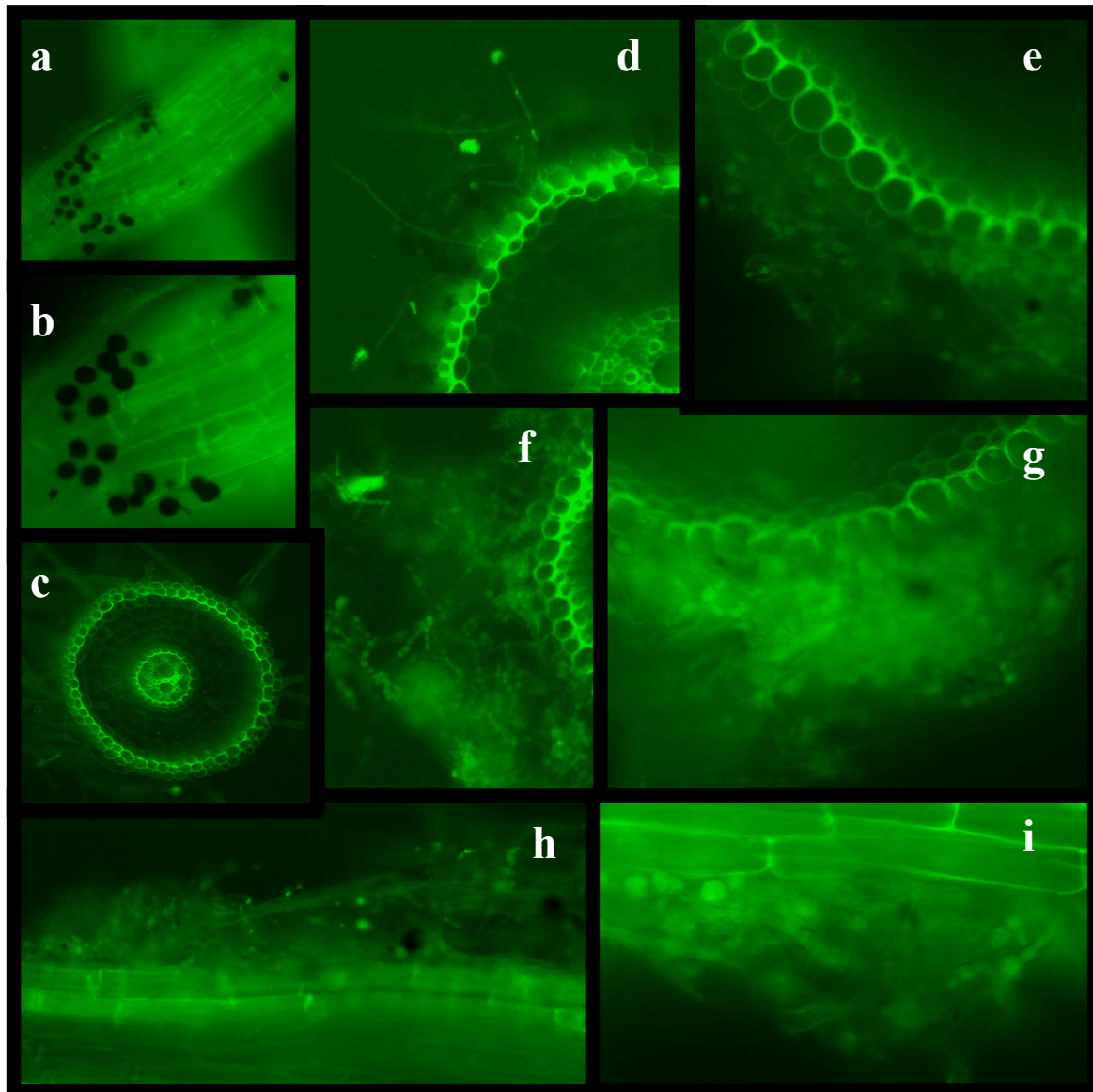


Figura 3.9 – Interação de *E. nigrum* com raízes de plantas axênicas da variedade SP70-1143 de cana-de-açúcar analisada por microscopia de epifluorescência. (a-b) Conídios não fluorescentes da linhagem P16 aderidos às raízes de cana-de-açúcar 12 horas após a inoculação (aumento de 100X e 200X, respectivamente). (c) Corte transversal de raiz não colonizada; note a fluorescência natural do tecido radicular (aumento de 100X). (d) Corte transversal de raiz colonizada pela linhagem P16-35gfp após 48 horas de incubação; hifas fluorescentes são visíveis na superfície do tecido cortical (aumento de 100X). (e) Corte transversal de raiz colonizada pela linhagem P16-35gfp após 72 horas de incubação; note a formação de uma rede de hifas emaranhadas na superfície da raiz (aumento de 200X). (f-g) Cortes transversais de raízes colonizadas pela linhagem P16-35gfp após 96 horas de incubação; note a extensa colonização superficial, representada pela rede de hifas fluorescentes (aumento de 100X e 200X, respectivamente). (h-i) Cortes longitudinais de raízes colonizadas pela linhagem P16-35gfp após 72 horas de incubação (aumento de 100X e 200X, respectivamente)

pois podem dessa maneira restaurar o equilíbrio natural e reforçar as defesas das plantas contra infecção por patógenos (PAPARU et al., 2008).

3.2.2.8 Interação de *E. nigrum* com cana-de-açúcar: análise por meio de reisolamento

A capacidade de *E. nigrum* colonizar endofiticamente cana-de-açúcar foi investigada por meio de inoculação em casa de vegetação e reisolamento. A introdução do gene de resistência a higromicina B e do gene *gfp* na linhagem P16 permitiu monitorar a população de *E. nigrum* ao longo do experimento, pela comparação dos isolados recuperados quanto à sensibilidade a este antibiótico e expressão de GFP. Além disso, a frequência de isolamento de *E. nigrum* foi comparada à frequência de isolamento total de fungos associados à cana-de-açúcar. Esta comparação também permitiu avaliar o potencial efeito da inoculação das linhagens P16 e P16-35gfp sobre a frequência total de isolamento de fungos. Neste trabalho, foi possível reisolar *E. nigrum* 20 e 60 dias após a inoculação das plantas (Figuras 3.10 e 3.11).

A análise do isolamento de fungos endofíticos de folhas não revelou diferenças significativas no número de UFC recuperado nas duas épocas de isolamento (Figura 3.10a). De fato, a maioria das colônias fúngicas obtidas após desinfecção superficial foram colônias de *E. nigrum*, evidenciando a capacidade deste fungo de colonizar os tecidos internos da planta, ao longo do tempo avaliado no experimento. De modo geral, o mesmo comportamento foi observado a partir do isolamento de fungos endofíticos das bainhas das folhas (Figura 3.10b). No entanto, foi verificada uma frequência significativamente maior de isolamento de *E. nigrum* a partir das plantas inoculadas com a linhagem transformada (P16-35gfp), aos 20 dias após a inoculação, mas esta frequência diminuiu com o aumento da idade das plantas.

Diferenças consistentes no padrão de colonização foram observadas a partir do isolamento de fungos epifíticos. Neste caso foi possível verificar um aumento no número de UFC recuperado 60 dias após a inoculação, não somente para o total de fungos epifíticos, mas também para *E. nigrum* (Figura 3.10c). Além disso, aos 20 dias após a inoculação, foi possível observar um aumento da frequência total de isolamento de fungos epifíticos a partir das plantas inoculadas com *E. nigrum* em comparação às plantas controle. Entretanto, este efeito não persistiu com o aumento da idade das plantas, provavelmente refletindo o estabelecimento de equilíbrio da comunidade fúngica do filoplano. O aumento da frequência de isolamento de fungos do filoplano relacionado à senescência do hospedeiro ou à senescência das folhas é um fenômeno comum reportado em vários trabalhos sobre análise da diversidade fúngica associada às plantas (FRÖHLICH; HYDE; PETRINI, 2000; GUO; HUANG; WANG, 2008).

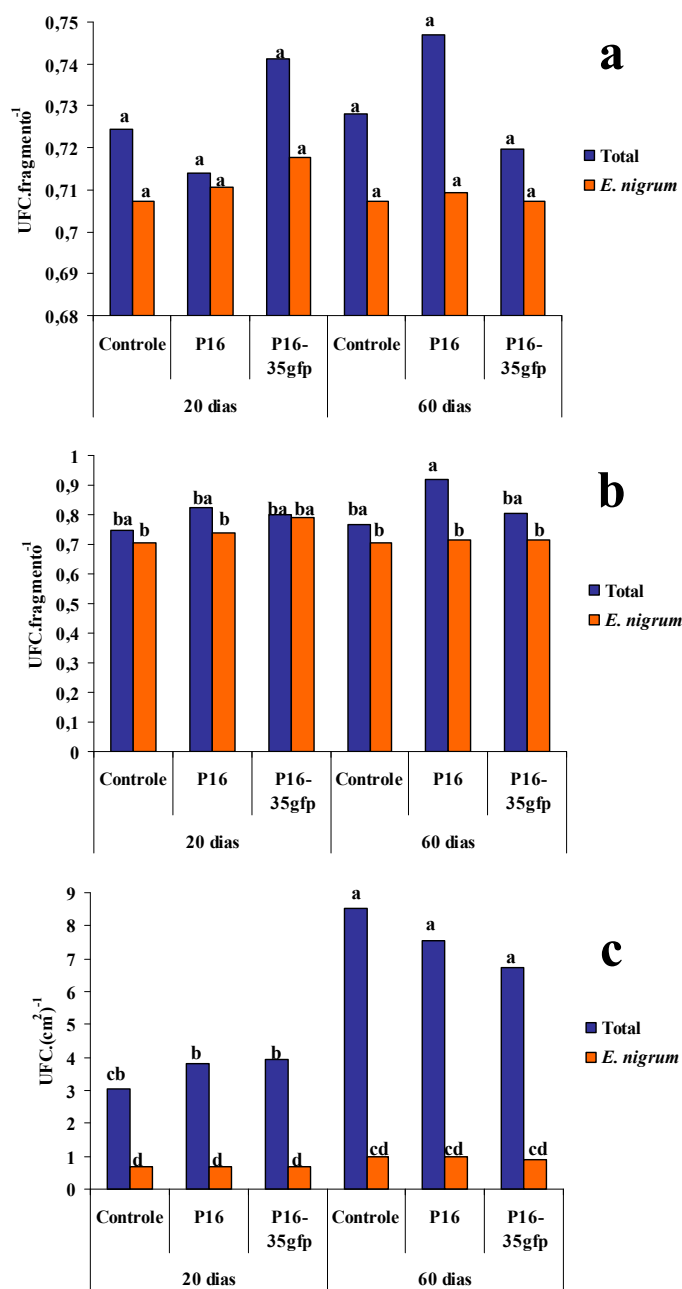


Figura 3.10 – Análise da colonização e reisolamento das linhagens P16 (selvagem) e P16-35gfp (transformada) de *E. nigrum* a partir de plantas da variedade SP80-1842 de cana-de-açúcar. Folhas de plantas de 30 dias de idade foram inoculadas em casa de vegetação com fragmentos miceliais das linhagens de *E. nigrum*. O isolamento foi realizado 20 e 60 dias após a inoculação. A frequência de isolamento de *E. nigrum* foi comparada com a frequência de isolamento total de fungos. (a-b) Análise do isolamento de fungos endofíticos de folhas e das bainhas das folhas, respectivamente; a frequência de isolamento é dada em UFC por fragmento foliar; as médias são baseadas nos dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, (c) Análise do isolamento de fungos epifíticos; a frequência de isolamento é dada em UFC por cm², considerando as faces superiores e inferiores dos fragmentos foliares utilizados; as médias são baseadas nos dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância

Em relação ao isolamento de fungos endofíticos das raízes, não foi possível recuperar *E. nigrum* após desinfecção superficial nas épocas de isolamento avaliadas. No entanto, foram observadas diferenças significativas na frequência total de isolamento de fungos endofíticos a partir das plantas inoculadas com as linhagens P16 ou P16-35gfp aos 20 e 60 dias após a inoculação (Figura 3.11a). Em relação à colonização da rizosfera, *E. nigrum* foi recuperado em maior frequência aos 20 dias após a inoculação (Figura 3.11b). Além disso, diferenças significativas (Figura 3.11b) foram encontradas para frequência total de fungos recuperados entre os dois controles utilizados (plantas não inoculadas e plantas inoculadas).

Foi observado um aumento da população de *E. nigrum* epifítica e redução da população da rizosfera com o aumento da idade das plantas, bem como a ausência de colonização endofítica das raízes, fato também observado na análise *in vitro* por microscopia de epifluorescência. Estes resultados sugerem que este fungo pode apresentar uma preferência ao ambiente epifítico. A linhagem P16 utilizada neste trabalho foi isolada como endofítica de folhas jovens de cana-de-açúcar (capítulo 2) e estudos anteriores relataram o isolamento de *E. nigrum* principalmente das folhas desta planta (STUART, 2006; ROMÃO; ARAÚJO, 2007; MENDES, 2008).

E. nigrum é comumente relatado como uma espécie ubíqua da comunidade epifítica (ANDREWS; HARRIS, 2000; PERELLÓ; SIMON; ARAMBARRI, 2002; SADAKA; PONGE, 2003; STOHR; DIGHTON, 2004), e algumas características como conídios altamente melanizados têm sido relacionadas à sua capacidade de sobreviver e colonizar o filoplano, devido à maior tolerância aos raios UV (DUGUAY; KLIRONOMOS, 2000; DE CAL et al., 2009). A razão para persistência de *E. nigrum* no filoplano em relação às raízes não é clara, mas pode estar relacionada a diferentes condições microbianas e fisiológicas presentes entre as diferentes partes das plantas (AKELLO et al., 2007). Muitos fungos endofíticos mostram certo grau de preferência de tecido por serem adaptados a condições particulares presentes em determinado órgão vegetal (KUMAR; HYDE, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005; AKELLO et al., 2007).

No entanto, um aspecto que deve ser levado em consideração, é que a taxa de colonização endofítica pode ser influenciada pelo tipo de inóculo utilizado e pelo substrato de crescimento das plantas (USUKI et al., 2002; BAILEY et al., 2008). Por exemplo, Akello et al. (2007) investigaram a capacidade de diferentes linhagens do entomopatógeno *B. bassiana* de colonizar endofiticamente plantas de banana. Estes autores demonstraram que a taxa de colonização variou com o método de inoculação, onde plantas que tiveram as raízes mergulhadas em uma suspensão

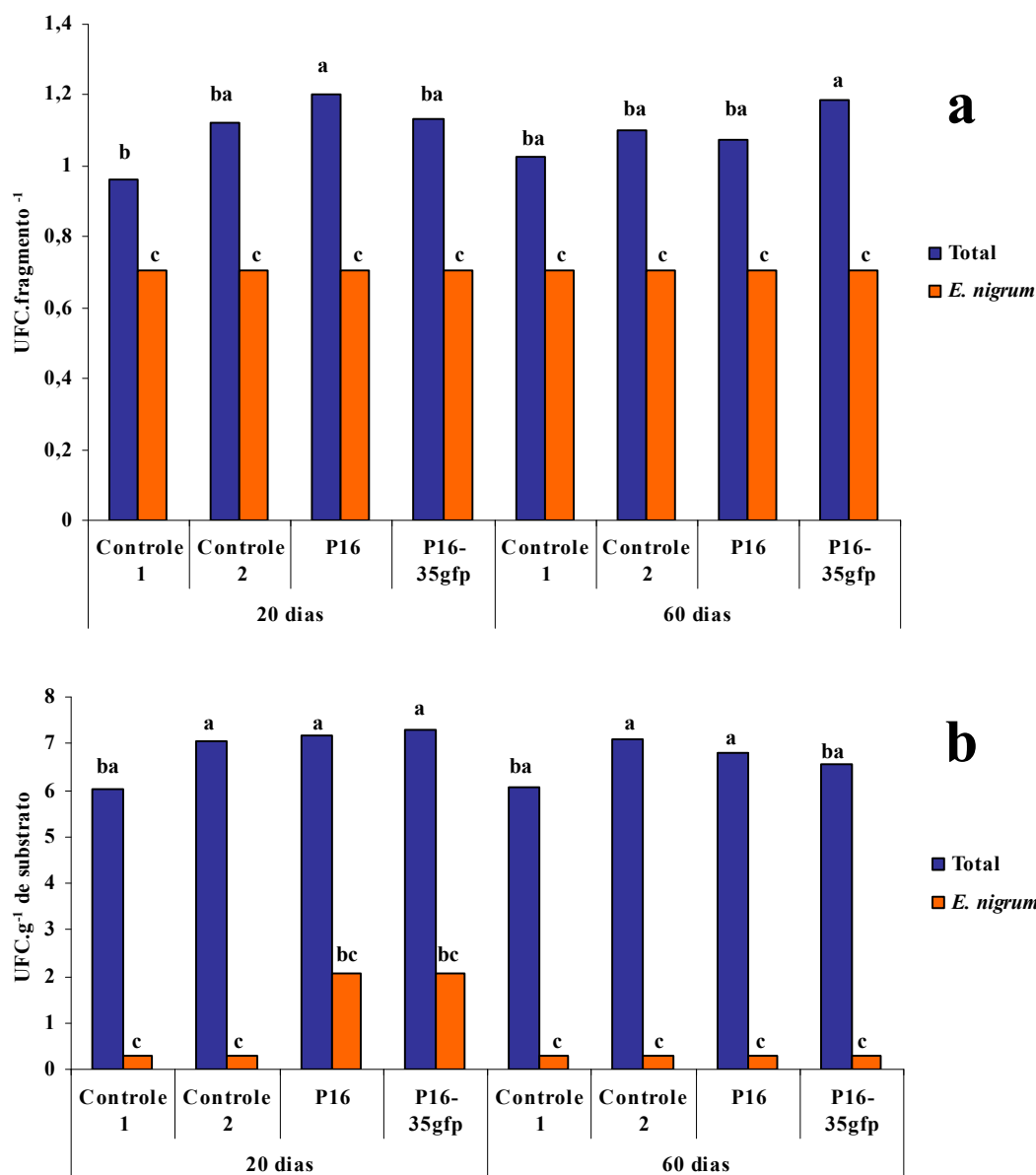


Figura 3.11 – Análise da colonização e reisolamento das linhagens P16 (selvagem) e P16-35gfp (transformada) de *E. nigrum* a partir de plantas da variedade SP80-1842 de cana-de-açúcar. Inicialmente, raízes de plantas de 30 dias de idade foram inoculadas em casa de vegetação com substrato sólido de trigo previamente colonizado pelas linhagens de *E. nigrum*. O isolamento foi realizado 20 e 60 dias após a inoculação. A frequência de isolamento de *E. nigrum* foi comparada com a frequência de isolamento total de fungos. Controle 1 refere-se às plantas não inoculadas enquanto que Controle 2 refere-se às plantas inoculadas somente com substrato sólido de trigo não colonizado pelos fungos. (a) Análise do isolamento de fungos endofíticos de raízes; a frequência de isolamento é dada em UFC por fragmento radicular; as médias são baseadas nos dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. (b) Análise do isolamento de fungos da rizosfera; a frequência de isolamento é dada em UFC por grama de substrato; as médias são baseadas nos dados transformados em $\text{Log}(x + 2)$. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância

de conídios foram significativamente mais colonizadas do que plantas inoculadas com substrato sólido de arroz colonizado previamente pelo fungo. Esta diferença foi relacionada à maior área de superfície para adesão dos conídios quando as raízes foram mergulhadas na suspensão conidial, do que em contato com o substrato sólido. Neste estudo foram utilizadas sementes de trigo colonizadas pelas linhagens fúngicas para inoculação das raízes em substrato não esterilizado, sendo possível reisolar *E. nigrum* da rizosfera após 60 dias em casa de vegetação. Embora não tenha sido possível reisolar *E. nigrum* como endófito das raízes, a frequência total de fungos endofíticos das raízes variou dependendo da linhagem de *E. nigrum* inoculada (Figuras 3.11a).

Com base no exposto, estas diferenças devem ser analisadas com cautela, visto que *E. nigrum* é conhecido por produzir compostos antimicrobianos (BAMFORD; NORRIS; WARD, 1961; ZHANG et al., 2007; KEMAMI WANGUN; HERTWECK, 2007) e a linhagem P16 utilizada neste estudo também apresentou capacidade de inibição *in vitro* de fungos e bactérias patogênicas de cana-de-açúcar (dados não mostrados). Dessa forma, em um primeiro momento, as diferenças na frequência total de fungos endofíticos de raiz poderiam ser relacionadas à possível alteração da capacidade de inibição microbiana pela linhagem P16-35gfp, no entanto, esta linhagem manteve a produção de halo de inibição *in vitro* contra diferentes bactérias e fungos (dados não mostrados). Outra hipótese é que as diferenças observadas sejam conseqüências de alterações na capacidade de competição por substrato entre as duas linhagens de *E. nigrum* e as demais espécies microbianas associadas às raízes. Embora a linhagem P16-35gfp tenha uma inserção do T-DNA em uma seqüência codificadora de um domínio altamente conservado de proteínas da superfamília GNAT, a qual está envolvida em diferentes processos celulares (VETTING et al., 2005), como a determinação do número de cópias do T-DNA não foi realizada para esta linhagem, é possível que ela apresente mais que uma cópia do inserto.

As interações entre fungos endofíticos não clavicipitáceos e as plantas hospedeiras são pobremente estudadas, assim como suas funções na interação endofítica (SCHULZ et al., 1998; ARNOLD et al., 2003), e menos conhecidas ainda são as interações destes fungos com outros microrganismos aos quais as plantas são associadas (RODRIGUEZ et al., 2009). Dessa maneira, outros experimentos devem ser realizados para confirmar se as respostas da comunidade fúngica endofítica de raiz à presença das linhagens P16 e P16-35gfp persistem ou se são devidas a erros de amostragem inerentes aos métodos de isolamento de fungos ou outros fatores.

Com relação ao método de inoculação, em um experimento realizado para avaliar os efeitos de *E. nigrum* sobre o crescimento de cana-de-açúcar (discutido adiante), plantas axênicas foram inoculadas com conídios e, após a colonização das raízes *in vitro*, as plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação em substrato não esterilizado. Neste caso, foi possível recuperar *E. nigrum* da rizosfera, mas também não foi possível reisolar este fungo por meio de desinfecção superficial das raízes, após 60 dias em casa de vegetação. Estes resultados demonstram, através de dois métodos de inoculação, que *E. nigrum* não foi capaz de estabelecer uma interação endofítica com as raízes de cana-de-açúcar nas condições avaliadas e também reforçam a necessidade de investigação prévia sobre o tipo de inóculo a ser utilizado em experimentos de interação endofítica para uma correta interpretação dos dados.

Conídios de *E. nigrum* são aplicados em massa para o controle efetivo de fungos patogênicos (LARENA; DE CAL; MELGAREJO, 2007; MARI et al., 2007; DE CAL et al., 2009) sendo capazes de persistir no ambiente por 120-200 dias após a inoculação (DE CAL et al., 2009). Neste trabalho, fragmentos miceliais foram inoculados nas folhas de cana-de-açúcar, e mesmo não sendo ideais para experimentos de inoculação, foi possível reisolar *E. nigrum* até 60 dias após a inoculação, não somente de folhas senescentes, mas também das folhas novas que surgiram nas plantas (dados não mostrados), bem como verificar um aumento na população epifítica entre as duas épocas amostradas. Estes dados sugerem que *E. nigrum*, após a inoculação pode se multiplicar e disseminar na planta hospedeira. Além disso, o método de isolamento de fungos epifíticos utilizado neste estudo recupera preferencialmente espécies que são capazes de produzir conídios ou esporos no filoplano (SANTAMARÍA; BAYMAN, 2005), o que pode indicar a ocorrência deste processo após a inoculação de fragmentos miceliais de *E. nigrum*.

Em conjunto, estes experimentos demonstraram a capacidade de *E. nigrum* colonizar endofiticamente as folhas de cana-de-açúcar, e também o filoplano e a rizosfera das plantas em casa de vegetação. De modo geral, não foram encontradas diferenças significativas quanto ao padrão de colonização entre as linhagens P16 e P16-35gfp. Estes resultados demonstram que a modificação genética da linhagem P16-35gfp não afetou a capacidade de colonização epifítica e endofítica de cana-de-açúcar e que *E. nigrum* é capaz de persistir no filoplano até 60 dias após a inoculação. A abordagem baseada em inoculação e isolamento utilizada neste trabalho também tem sido reportada para investigar o potencial de colonização endofítica de diferentes espécies de fungos visando novas estratégias de controle biológico (BAILEY et al., 2008; MEJÍA et al.,

2008; AKELLO et al., 2007; DE SOUZA et al., 2008; POSADA; VEGA, 2005; PAPARU et al., 2008; QUESADA-MORAGA et al., 2006; GÓMEZ-VIDAL et al., 2006).

A identidade dos reisolados de *E. nigrum* foi avaliada pela sensibilidade a higromicina B, em comparação as linhagens originais. Todos os isolados obtidos 20 dias após a inoculação, oriundos das plantas inoculadas com a linhagem P16, foram sensíveis a higromicina B. Do mesmo modo, 100% das colônias recuperadas das plantas inoculadas com a linhagem P16-35gfp foram resistentes a higromicina B e expressaram GFP no micélio. Neste período, não foram obtidas colônias de *E. nigrum* das plantas controle. Das colônias recuperadas 60 dias após a inoculação, 100% das colônias originadas das plantas inoculadas com a linhagem P16 foram sensíveis ao antibiótico, bem como as colônias reisoladas das plantas controle. No entanto, das colônias provenientes das plantas tratadas com a linhagem P16-35gfp, 85,8% foram resistentes a higromicina B e expressaram a proteína GFP.

Além da sensibilidade a higromicina B, os reisolados de *E. nigrum* obtidos 20 dias após a inoculação foram comparados com as linhagens originais por meio de marcadores RAPD. Esta análise mostrou que 100% dos reisolados que foram sensíveis a higromicina B apresentaram o mesmo perfil de RAPD que a linhagem original P16, com os três oligonucleotídeos utilizados (Figura 3.12). Do mesmo modo, o perfil de 96,16% dos reisolados resistentes a higromicina B foi o mesmo da linhagem original P16-35gfp, exceto para um reisolado (3,84%), onde foi possível identificar polimorfismos com os três primers utilizados (Figura 3.12). Estes polimorfismos apareceram como fragmentos extras neste reisolado em comparação as linhagens originais.

A análise de fingerprint de DNA não foi realizada para os reisolados obtidos após 60 dias, não sendo possível concluir sobre a origem das colônias sensíveis a higromicina B recuperadas das plantas inoculadas com a linhagem P16-35gfp e das plantas controle. Estas linhagens sensíveis podem ter sido provenientes de propágulos das outras plantas na casa de vegetação inoculadas com a linhagem selvagem P16, do ambiente da casa de vegetação ou mesmo terem sido originadas devido à perda do transgene. Estes resultados demonstram a aplicação de linhagens marcadas, associada ao uso de marcadores moleculares, para o monitoramento da população de *E. nigrum* em cana-de-açúcar. Esta abordagem pode ser utilizada para detectar e separar as linhagens introduzidas daquelas que naturalmente ocorrem na planta hospedeira, como verificado para outros fungos (LIMA et al., 2003; CHATTERTON; JAYARAMAN; PUNJA, 2008). Como relatado anteriormente, *E. nigrum* é conhecido por sua atividade de biocontrole de

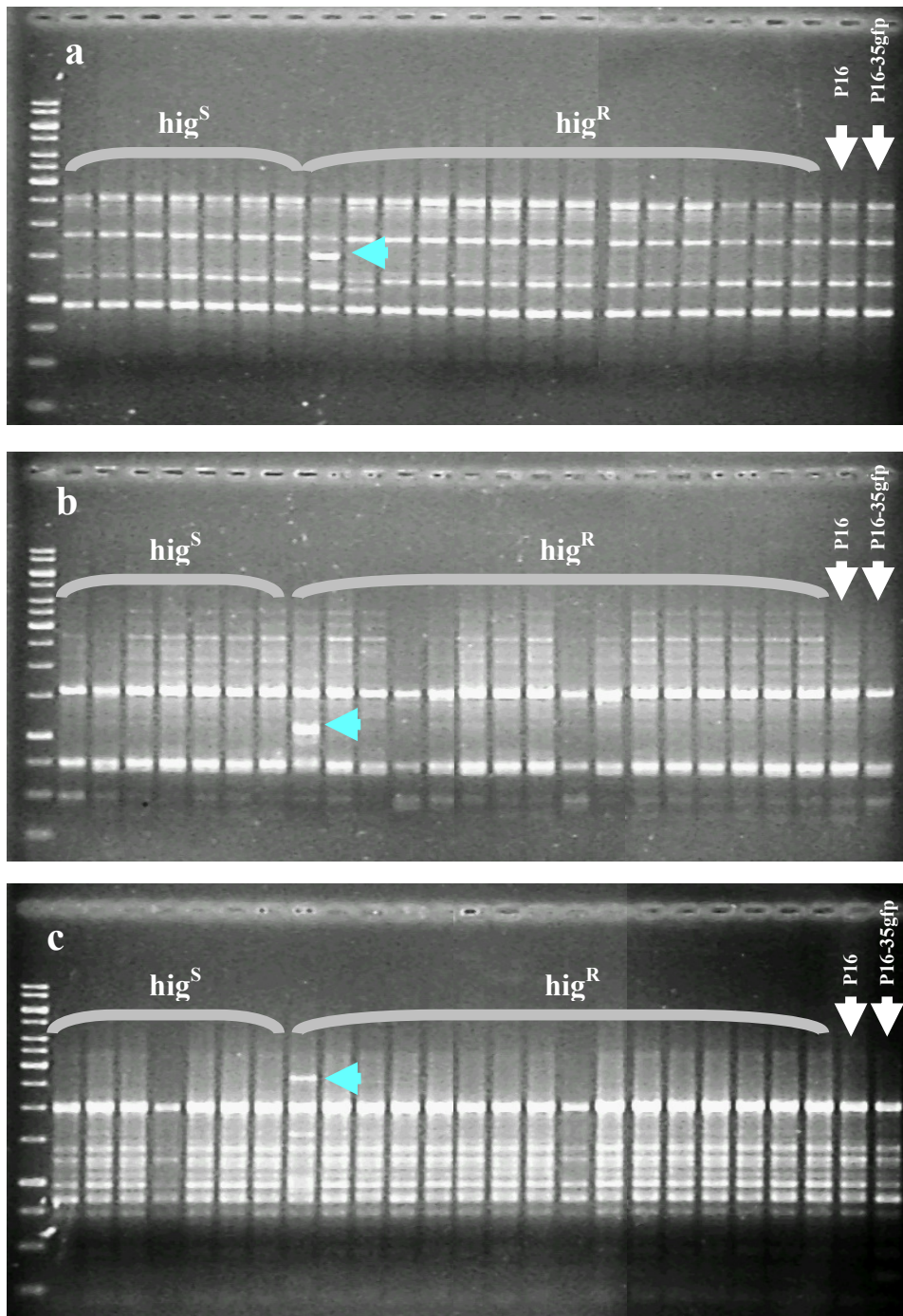


Figura 3.12 – Confirmação da identidade dos reisolados de *E. nigrum* em comparação as linhagens originais P16 e P16-35gfp (setas brancas à direita em cada gel) por meio da análise de marcadores RAPD. A figura representa o perfil de RAPD de um grupo de reisolados sensíveis (hig^S) e resistentes (hig^R) a higromicina B recuperado a partir de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-1842 inoculadas com a linhagem P16 e P16-35gfp, respectivamente, 20 dias após a inoculação. (a) Perfil de RAPD obtido com o primer X12. (b) Perfil de RAPD obtido com o primer X17. (c) Perfil de RAPD obtido com o primer X19. As setas marcadas em azul indicam polimorfismos apresentados por um reisolado de *E. nigrum* resistente a higromicina B e expressando GFP no micélio, em comparação as linhagens originais P16 e P16-35gfp

fitopatógenos, e a metodologia de transformação desenvolvida neste trabalho abre a possibilidade de introdução de genes visando a melhor performance das linhagens, como já tem sido demonstrado em outros fungos (St. LEGER et al., 1996; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2008). No entanto, um aspecto que deve ser levado em consideração é a estabilidade genética da linhagem fúngica.

Neste trabalho, a análise de RAPD dos isolados recuperados das plantas de cana-de-açúcar revelou a presença de polimorfismos (Figura 3.12) em um reisolado resistente a higromicina B e expressando GFP no micélio (correspondente a 3,84% das linhagens reisoladas). Embora a linhagem P16-35gfp tenha apresentado elevada estabilidade na ausência do agente seletivo e a análise de RAPD tenha sido realizada com reisolados monospóricos e em duplicata, estes resultados sugerem a possível ocorrência de rearranjos no genoma da linhagem após a passagem pela planta hospedeira.

Como relatado por Migheli et al. (1996), a simples avaliação do fenótipo do transformante não fornece evidência sobre a estabilidade das seqüências transformantes ao nível molecular, especialmente se o transformante apresenta mais que uma cópia do inserto. Nesse contexto, a análise de *Southern blot* deste reisolado de *E. nigrum* em comparação à linhagem transformada original poderia elucidar a natureza dos polimorfismos observados na análise de RAPD. Em todo caso, de modo semelhante à abordagem utilizada neste trabalho, a utilidade da técnica de RAPD para detecção de polimorfismos em linhagens transformadas ou mutantes também tem sido verificada em outras espécies de fungos (VALÈ et al., 1998; MES et al., 1999; FÁVARO et al., 2007).

A estabilidade de genes introduzidos observada em condições de laboratório pode ser bastante diferente da estabilidade *in planta* (LESLIE; DICKMAN, 1991) e a ocorrência de modificações genéticas em linhagens transformadas após a passagem pela planta hospedeira também tem sido observada em alguns fungos. Por exemplo, quando Dickman e Partridge (1989) inocularam transformantes de *F. moniliforme* e *F. graminearum* mitoticamente estáveis *in vitro* em plantas de milho, as linhagens recuperadas exibiram grandes alterações no DNA introduzido. Por meio da análise de *Southern blot*, estes autores observaram extensivos rearranjos e deleções das seqüências do vetor após a passagem pelo hospedeiro e sugeriram que a estabilidade do DNA introduzido pode ser afetada por situações ambientais como estresse causado pela infecção da planta. O mesmo comportamento foi verificado em *F. moniliforme* (LESLIE; DICKMAN, 1991),

Cochliobolus heterostrophus (KELLER; BERGSTROM; YODER, 1991) e *Magnaporthe grisea* (TOOLEY; LEUNG; LEONG, 1992).

Mais recentemente, Mikkelsen et al. (2001) obtiveram linhagens transformadas do fungo endofítico *N. lolii* expressando GFP e verificaram por meio de hibridização de *Southern blot* que as linhagens perderam 1-2 cópias do DNA integrado após reisolamento da planta hospedeira, sem perder o fenótipo fluorescente. Estes autores relacionaram a perda do DNA integrado à natureza heterocariótica dos transformantes obtidos por protoplasto-PEG, os quais foram considerados com sendo heterocários contendo diferentes núcleos transformados.

Rearranjos ou perdas de cópias das seqüências do vetor também têm sido observados após sucessivas passagens em meio não seletivo (LESLIE; DICKMAN, 1991; LILJEROTH; JANSSON; SCHÄFER, 1993; MIGHELI et al., 1996) ou após reisolamento a partir do solo (MIGHELI et al., 1996). De modo geral, a abordagem utilizada no presente trabalho permitiu identificar a ocorrência de modificações na linhagem transformada de *E. nigrum* após a passagem pela planta, demonstrando a importância deste tipo de monitoramento para acessar a estabilidade genética *in vivo* de linhagens fúngicas geneticamente modificadas.

3.2.2.9 Interação de *E. nigrum* com cana-de-açúcar: efeito da colonização de *E. nigrum* sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação

Este trabalho investigou o efeito da colonização de raízes de plantas axênicas de cana-de-açúcar pelas linhagens P16 (selvagem) e P16-35gfp (transformada) de *E. nigrum* sobre o crescimento das plantas após a aclimatização, por meio da análise do acúmulo de massa fresca e seca das raízes e da parte aérea. As respostas das plantas da variedade SP70-1143 de cana-de-açúcar à inoculação com *E. nigrum* estão sumarizadas nas Tabelas 3.2 e 3.3.

É conhecido que a aclimatização (a transferência das plantas do cultivo *in vitro* para o cultivo *ex vitro*) pode constituir um período de estresse para muitas espécies de plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), no entanto, este período também é considerado propício para a introdução de microrganismos benéficos como bactérias endofíticas expressando genes heterólogos visando o controle de pragas em cana-de-açúcar (QUECINE et al., 2008) e também bactérias diazotróficas nesta cultura (REIS et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2006). Neste estudo, plantas axênicas foram colonizadas por 72 horas pelas linhagens, antes da aclimatização, pois com este período foi observada a formação de uma película de micélio ao redor das raízes,

Tabela 3.2 - Respostas da variedade SP70-1143 de cana-de-açúcar à inoculação das linhagens selvagem e transformada de *E. nigrum*, quanto ao acúmulo de massa fresca nas raízes, na parte aérea e total, após 60 dias de crescimento em casa de vegetação

Tratamento	Acúmulo de massa fresca ^a			
	Raiz	Parte aérea	Total	Raiz/parte aérea ^b
SP70-1143 (controle)	12,123 ^a	14,118 ^a	26,241 ^a	0,86578 ^b
SP70-1143 (P16)	11,663 ^a	10,664 ^b	22,327 ^b	1,09208 ^a
SP70-1143 (P16-35gfp)	10,162 ^a	8,045 ^c	18,207 ^c	1,26276 ^a

(a) Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância (médias de 10 repetições). (b) Razão entre massa fresca de raiz e de parte aérea.

Tabela 3.3 - Respostas da variedade SP70-1143 de cana-de-açúcar à inoculação das linhagens selvagem e transformada de *E. nigrum*, quanto ao acúmulo de massa seca nas raízes, na parte aérea e total, após 60 dias de crescimento em casa de vegetação

Tratamento	Acúmulo de massa seca ^a			
	Raiz	Parte aérea	Total	Raiz/parte aérea ^b
SP70-1143 (controle)	1,206 ^{ba}	4,076 ^a	5,282 ^a	0,30269 ^b
SP70-1143 (P16)	1,527 ^a	3,039 ^b	4,566 ^a	0,50920 ^a
SP70-1143 (P16-35gfp)	1,137 ^b	1,994 ^c	3,131 ^b	0,56934 ^a

(a) Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância (médias de 10 repetições). (b) Razão entre massa seca de raiz e de parte aérea.

como visualizado *in vitro* por microscopia de fluorescência. Não foram observadas diferenças na sobrevivência à aclimatização das plantas inoculadas em relação às não inoculadas, ou seja, todas as plantas sobreviveram ao processo de aclimatização utilizado.

Após 60 dias de crescimento em casa de vegetação, o acúmulo de massa seca das raízes de plantas colonizadas pela linhagem selvagem foi maior em comparação às plantas controle, no entanto este efeito foi inverso nas plantas inoculadas com a linhagem transformada (Tabela 3.3). Diferenças no comprimento das raízes das plantas inoculadas em relação às não inoculadas também foram observadas (dados não mostrados).

De modo geral, embora a inoculação da linhagem P16 tenha levado a uma diminuição da massa fresca e seca da parte aérea das plantas (Tabelas 3.2 e 3.3), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto à massa seca total das plantas inoculadas com esta linhagem em comparação as plantas controle (Tabela 3.3). Uma redução expressiva da biomassa vegetal foi observada nas plantas inoculadas com a linhagem P16-35gfp, característica que é associada ao estilo de vida de fungos parasitas (Tabelas 3.2 e 3.3). Embora as respostas das plantas tenham sido diferentes para as duas linhagens de *E. nigrum*, em ambas as associações um

aumento na razão entre massa seca de raiz e de parte aérea foi verificado (Tabela 3.3), o que é indicativo da maior alocação de biomassa para as raízes do que para a parte aérea na presença de *E. nigrum*. Respostas semelhantes também foram relatadas para cana-de-açúcar inoculada com diferentes bactérias endofíticas diazotróficas (OLIVEIRA et al., 2002) em condições similares às utilizadas neste trabalho (mesma variedade de cana-de-açúcar e substrato comercial). Estes resultados demonstram que a inoculação das linhagens de *E. nigrum* pode ter alterado a partição de carbono e matéria seca entre as diferentes partes das plantas. A produção de reguladores do crescimento vegetal por fungos endofíticos tem sido proposta como uma das causas das respostas de crescimento das plantas à inoculação por estes fungos (NASSAR et al., 2005; SIRRENBORG et al., 2007; KHAN et al., 2008; HAMAYUN et al., 2009), no entanto, não é conhecido se *E. nigrum* produz tais substâncias.

Antes da aclimatização, o isolamento de fungos a partir do substrato comercial não recuperou *E. nigrum*, indicando que os efeitos observados foram decorrentes da colonização pelas linhagens P16 e P16-35gfp. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de interação com outros microrganismos endofíticos ou da rizosfera das plantas, uma vez que nos experimentos de reisolamento anteriores, embora realizados com outra variedade de cana-de-açúcar, a presença das linhagens de *E. nigrum* afetou diferentemente a frequência de isolamento total de fungos endofíticos de raiz. Ao final do período avaliado, foi possível reisolar *E. nigrum* selvagem e transformante a partir do substrato rizosférico das plantas, mas não a partir das raízes após desinfecção superficial (dados não mostrados).

A interação de isolados endofíticos de *E. nigrum* com a planta hospedeira tem sido caracterizada quanto à capacidade de inibição de fitopatógenos. Por exemplo, Campanile, Ruscelli e Luisi (2007) investigaram a capacidade antagonista de isolados endofíticos de *E. nigrum* de *Quercus* sp. contra o patógeno *Diplodia corticola*. Os autores primeiramente realizaram testes de patogenicidade dos endófitos e não observaram sintomas de doença nas plantas inoculadas com *E. nigrum* e também relataram o reisolamento das linhagens introduzidas. Os autores verificaram redução do crescimento do patógeno em cultura pareada *in vitro* bem como dos sintomas da doença em plântulas de *Quercus* sp. em casa de vegetação.

Alguns efeitos de isolados endofíticos *E. nigrum* sobre o desenvolvimento da planta hospedeira também foram estudados por Newcombe et al. (2009) para a espécie invasora *Centaurea stoebe*. Segundo os autores, diferenças na presença e ausência de endófitos específicos

poderiam afetar a capacidade invasora desta planta que é nativa da Eurásia e introduzida na América do Norte e outras regiões. Os autores verificaram que filtrados de *E. nigrum* inibiram a germinação de sementes de *Festuca idahoensis*, a qual é considerada uma planta competidora de *C. stoebe* em áreas invadidas, demonstrando que endófitos específicos produzem efeitos alelopáticos que podem favorecer *C. stoebe* na competição com outras plantas. Além disso, estes autores verificaram que plantas de *C. stoebe* inoculadas com *E. nigrum* foram significativamente menos predadas pelo coleóptero herbívoro *Larinus minutus*, o qual foi liberado na América do Norte para o controle biológico de *C. stoebe*. Estes efeitos foram associados à produção de compostos orgânicos voláteis pelos fungos endofíticos.

Neste trabalho, uma redução significativa da biomassa vegetal foi verificada nas plantas inoculadas com a linhagem transformada de *E. nigrum*. Isto indica que nesta etapa do desenvolvimento da planta esta linhagem afetou negativamente o crescimento, mas tendo em vista que em experimentos *in vitro* nenhum sintoma de doença foi observado, pode ser sugerido que a presença destes microrganismos somente resulta em aumento do *fitness* em condições específicas, como por exemplo, presença de patógenos e/ou pragas, como já relatado para outras interações envolvendo este microrganismo (DE CAL et al., 2009; LARENA; DE CAL; MELGAREJO, 2007; NEWCOMBE et al., 2009).

Embora outras análises sejam necessárias para acessar a reprodutibilidade deste efeito (por exemplo, inoculação de diferentes concentrações de conídios; utilização de toletes de cana-de-açúcar; diferentes variedades de cana-de-açúcar e de outras plantas; análise na presença de diferentes tipos de estresse), é possível que a modificação genética deste transformante tenha levado aos efeitos observados. Conforme descrito anteriormente, esta linhagem apresenta inserção do T-DNA em uma seqüência codificadora de um domínio conservado da superfamília de proteínas GNAT (N-acetiltransferases relacionadas à GCN5) a qual está envolvida em diferentes processos celulares (VETTING et al., 2005; BROSCHE; LOIDL; GRAESSLE, 2008). No entanto, muito pouco é conhecido sobre as funções deste grupo de proteínas em fungos filamentosos (GRIMALDI et al., 2006; REYES-DOMINGUEZ et al., 2008).

Embora outros estudos genéticos sobre o transformante P16-35gfp de *E. nigrum* sejam necessários, os resultados encontrados no presente trabalho, sobre alterações genéticas que levam à alteração no comportamento de fungos durante a interação com a planta, também foram relatados por Freeman e Rodriguez (1993). Estes autores utilizaram mutagênese por ultravioleta

para obtenção de mutantes não patogênicos de *C. magna*, e relataram um mutante que se comportou como um mutualista, protegendo as plantas hospedeiras contra patógenos. A análise de segregação deste transformante mostrou que o fenótipo mutualista foi devido à alteração em um único gene. Posteriormente, Redman, Ranson e Rodriguez (1999) obtiveram centenas de transformantes deste mesmo fitopatógeno por meio da técnica REMI (integração mediada por enzima de restrição) e encontraram diferentes mutantes não patogênicos e com estilos de vida variando entre mutualista e comensalista, no entanto os genes interrompidos responsáveis por estes fenótipos não foram identificados.

Em outro caso, Tanaka et al. (2006) também investigaram transformantes obtidos por REMI na busca de alterações na interação endofítica do fungo clavicípiceo *Epichloë festucae* com *Lolium perenne* e encontraram que mutações em um único gene (NADPH oxidase, *noxA*) levaram a mudança no estilo de vida mutualista para parasítico, descrevendo uma nova função para as espécies reativas de oxigênio na regulação da interação mutualística. Tais estudos fornecem um maior entendimento da base genética e da plasticidade da interação simbiótica entre fungos e plantas.

No presente estudo, uma metodologia de transformação mediada por *A. tumefaciens* foi utilizada para obtenção de mutantes do fungo *E. nigrum*, isolado de cana-de-açúcar, expressando a proteína GFP. Esta abordagem permitiu a avaliação de aspectos básicos da interação de *E. nigrum* com cana-de-açúcar, demonstrando que este fungo é capaz de colonizar os tecidos desta planta e persistir na comunidade epifítica das folhas. Esta abordagem pode ser utilizada para obter linhagens marcadas com genes repórteres, facilitando o monitoramento da população de *E. nigrum* em programas de controle biológico de fitopatógenos e alertando sobre a importância da estabilidade de linhagens fúngicas geneticamente modificadas que venham a ser introduzidas. Este trabalho também demonstrou que a transformação mediada por *A. tumefaciens* pode ser utilizada como uma ferramenta de mutagenese insercional aleatória neste fungo endofítico, permitindo a identificação de genes envolvidos na interação fungo-planta e facilitando estudos genéticos futuros nesta espécie de reconhecido potencial biotecnológico.

Referências

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

- ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A.; DAS, A.; GALGIANI, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 181, p. 2106–2110, 2000.
- AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C. S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 96, p. 34–42, 2007.
- ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 467-470, 2005.
- AMEY, R. C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P. R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 4–11, 2002.
- 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.
- ARAÚJO, W. L.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Microbial communities of transgenic sugarcane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOSAFETY OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS, 8, 2004, Montpellier. **Anais...** Montpellier: França, 2004. p. 211-215.
- ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR. W.; AGUILAR-VILDOSO C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- ARNOLD, E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 51–66, 2007.
- ARNOLD, E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, Brooklyn, v. 88, p. 541–549, 2007.
- ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 15649–15654, 2003.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 1–36, 2000.
- AZEVEDO, L. C. B. **Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 110p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with β -glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 810-815, 2000.
- BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M.D.; CROZIER, J.; THOMAS, S.E.; SAMUELS, G.J.; VINYARD, B.T.; HOLMES, K.A. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, 24-35, 2008.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Victoria, v.29, p. 417-423, 2002.
- BAMFORD, P. C.; NORRIS, G. L. F.; WARD, G. Flavipin production by *Epicoccum* spp. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 44, p. 354–356, 1961.
- BANDARA, W. M.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 31, p. 645-650, 2006.
- BETTS, M. F.; TUCKER, S. L.; GALADIMA, N.; MENG, Y.; PATEL, G.; LI, L.; DONOFRIO, N.; FLOYD, A.; NOLIN, S.; BROWN, D.; MANDEL, M. A.; MITCHELL, T. K.; XU, J. R.; DEAN, R. A.; FARMAN, M. L.; ORBACH, M. J. Development of a high throughput transformation system for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1035–1049, 2007.
- BLAISE, F.; REMY, E.; MEYER, M.; ZHOU, L.; NARCY, J. P.; ROUX, J.; BALESSENT, M. H.; ROUXEL, T. A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 123-138, 2007.
- BROSCH, G.; LOIDL, P.; GRAESSLE, S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 409–439, 2008.
- BUNDOCK, P.; DENDULKRAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 14, p. 3206-3214, 1995.
- CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 237–246, 2007.
- CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J. F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azophilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 447–452, 2003.

- CAO, Y.; PENG, G.; HE, Z.; WANG, Z.; YIN, Y.; XIA, Y. Transformation of *Metarhizium anisopliae* with benomyl resistance and green fluorescent protein genes provides a tag for genetically engineered strains. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 29, p. 907-911, 2007.
- CHATTERTON, S.; JAYARAMAN, J.; PUNJA, Z. K. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulate*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 267–278, 2008.
- CHEPLICK, G. P. Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from eurasia and north africa under extreme resource limitation. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 202–210, 2006.
- CHILTON, M. D.; CURRIER, T. C.; FARRAND, S. K.; BENDICH, A. J.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 71, p. 3672–3676, 1974.
- COMBIER, J. P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 220, p. 141-148, 2003.
- COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 259–264, 2001.
- CULLINGS, K. W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 1, p. 233-240, 1992.
- DANTI, R.; SIEBER, T. N.; SANGUINETI, G.; RADDI, P.; DI LONARDO, V. Decline in diversity and abundance of endophytic fungi in twigs of *Fagus sylvatica* L. after experimental long-term exposure to sodium dodecylbenzene sulphonate (SDBS) aerosol. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, p. 696-702, 2002.
- DEAKIN, W. J.; BROUGHTON, W. J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 312-320, 2009.
- DE CAL, M. A.; LARENA, I.; LIÑÁN, M.; TORRES, R.; LAMARCA, N.; USALL, J.; DOMENICHINI, P.; BELLINI, A.; ERIBE, X. O.; MELGAREJO, P. Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, p. 592–605, 2009.
- DE SOUZA, J.T.; BAILEY, B.A.; POMELLA, A.W.; ERBE, E.F.; MURPHY, C.A.; BAE, H.; HEBBAR, P.K. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 36-45, 2008.

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

DU, X.; WANG, W.; KIM, R.; YAKOTA, H.; NGUYEN, H.; KIM, S. H. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. **Biochemistry**, Washington, v. 40, p. 14166-14172, 2001.

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

DUGUAY, K. J.; KLIRONOMOS, J. N. Direct and indirect effects of enhanced UV-B radiation on the decomposing and competitive abilities of saprobic fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 14, p. 157-164, 2000.

DYDA, F.; KLEIN, D. C.; HICKMAN, A. B. GCN5-related *N*-acetyltransferases: a structural overview. **Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 29, p. 81-103, 2000.

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

ELLIS, D. H.; GRIFFITHS, D. A. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 20, p. 1379-1386, 1974.

EYNCK, C.; KOOPMANN, B.; GRUNEWALDT-STOECKER, G.; KARLOVSKY, P.; VON TIEDEMANN, A. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 118, p. 259-274, 2007.

FABRE, E.; HURT, E. Nuclear transport. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 6, p. 335-342, 1994.

FANG, W.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHENG, X.; DUAN, H.; LI, Y.; PEI, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 85, p. 18-24, 2004.

FÁVARO L. C. L.; ARAÚJO, W. L.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; AZEVEDO, J. L.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chlorate. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 93-105, 2007.

FELITTI, S.; SHIELDS, K.; RAMSPERGER, M.; TIAN, P.; SAWBRIDGE, T.; WEBSTER, T.; LOGAN, E.; ERWIN, T.; FORSTER, J.; EDWARDS, D.; SPANGENBERG, G. Transcriptome analysis of *Neotyphodium* and *Epichloë* grass endophytes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, p. 465-475, 2006.

FERNÁNDEZ-ÁBALOS, J. M.; FOX, H.; PITT, C.; WELLS, B.; DOONAN, J. H. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 27, p. 121–130, 1998.

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

FISHER, P.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oriza sativa* L.). **New Phytologist**, London, v. 120, p. 137-143, 1992.

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

FLOWERS, J. L.; VAILLANCOURT, L. J. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 380–388, 2005.

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

FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 1202–1212, 2000.

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

GÓMEZ-VIDAL, S.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.-B.; SALINAS, J. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. **Micron**, Oxford, v. 37, p. 624-632, 2006.

GONZALEZ, H. H. S. **Caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas isoladas de *Saccharum sp.* (cana-de-açúcar) cultivadas sob adubação orgânica ou fertilizante nitrogenado ou sem adubação.** 2008. 141p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília:ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-170.

GRIMALDI, B.; COIRO, P.; FILETICI, P.; BERGE, E.; DOBOSY, J. R.; FREITAG, M.; SELKER, E. U. BALLARIO, P. The *Neurospora crassa* white collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 17, p. 4576–4583, 2006.

GRIMALDI, B.; RAAF, M.A.; FILETICI, P.; OTTONELLO, S.; BALLARIO, P. *Agrobacterium*-mediated gene transfer and enhanced green fluorescent protein visualization in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*: a first step towards truffle genetics. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 69–74, 2005.

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

GRUNEWALDT-STÖCKER, G.; RIEDIGER, N.; DIETRICH, C. Suitability of GFP-transformed isolates of the fungal root endophyte *Acremonium strictum* W. Gams for studies on induced *Fusarium*-wilt resistance in flax. **Plant Root**, Toyama, v. 1, p. 46-56, 2007.

GUO, L. D.; HUANG, G. R.; WANG, Y. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 50, p. 997–1003, 2008.

HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; AHMAD, N.; TANG, D.-S. et al. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 627–632, 2009.

HANIF, M.; PARDO, A.G.; GORFER, M.; RAUDASKOSKI, M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. **Current Genetics**, Berlin, v. 41, p. 183–188, 2002.

HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 54, p. 323-342, 2009.

HASHEM, M.; ALI, E. H. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root rot of cotton seedlings. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 37, p. 283-297, 2004.

HE, Z. M.; PRICE, M. S.; OBRIAN, G. R.; GEORGIANNA, D. R.; PAYNE, G. A. Improved protocols for functional analysis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. **BMC Microbiology**, London, v., 7, p. 104, 2007.

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

HELLENS, R.; MULLINEAUX, P.; KLEE, H. Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 446-451, 2000.

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

HIGGINS, K. L.; ARNOLD, A. E.; MIADLIKOWSKA, J.; SARVATE, S. D.; LUTZONI, F. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 42, p. 543-555, 2007.

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

HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R. T.; CHILTON, M. D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 168, p. 1291-1301, 1986.

HU, G.; St LEGER, R. J. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 6383-6387, 2002.

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

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 33, p. 163-173, 2008.

INGLIS, P. W.; ARAGÃO, F.J.L.; FRAZÃO, H.; MAGALHÃES, B.P.; VALADARES-INGLIS, M. C. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, p. 249-254, 2000.

JEON, J.; PARK, S.-Y.; CHI, M.-H.; CHOI, J.; PARK, J.; RHO, H.-S.; KIM, S.; GOH, J. et al. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. **Nature Genetics**, London, v. 39, p. 561-565, 2007.

KAHMANN, R.; BASSE, C. REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 221-229, 1999.

- KAWAMATA, H.; NARISAWA, K.; HASHIBA, T. Suppression of rice blast by phylloplane fungi isolated from rice plants. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 70, p. 131–138, 2004.
- KELLER, N. P.; BERGSTROM, G. C.; YODER, O. C. Mitotic stability of transforming DNA is determined by its chromosomal configuration in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. **Current Genetics**, Berlin, v. 19, p. 227-233, 1991.
- KEMAMI WANGUN, H. V.; HERTWECK, C. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 5, p. 1702–1705, 2007.
- KHAN, S. A.; HAMAYUN, M.; YOON, H.; KIM, H.-Y.; SUH, S.-J. et al. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. **BMC Microbiology**, London, v. 8, p. 231-240, 2008.
- KIM, S. R.; LEE, J.; JUN, S. H.; PARK, S.; KANG, H. G.; KWON, S.; AN, G. Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 761-773, 2003.
- KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 17, p. 69-90, 2004.
- LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Org.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998, p. 93-109.
- LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSKY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 22, p. 29-37, 2006.
- LARENA, I.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P. Effects of stabilizers on shelf-life of *Epicoccum nigrum* formulations and their relationship with biocontrol of postharvest brown rot by *Monilinia* of peaches. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.102, p. 570–582, 2007.
- LARRAINZAR, E.; O'GARA, F.; MORRISSEY, J. P. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 257-277, 2005.
- LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMON, M. R.; MORENO, V. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 23, p. 565–572, 2007.
- LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHUTZ, A.; CHEN, S.; MITINA, G. V.; ZIMMERMANN, G.; SCHAIRER, H. U. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 111–119, 2004.

LESLIE, J. F.; DICKMAN, M. B. Fate of DNA encoding hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 1423-1429, 1991.

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

LILJEROTH, E.; JANSSON, H. B.; SCHÄFER, W. Transformation of *Bipolaris sorokiniana* with the GUS gene and use for studying fungal colonization of barley roots. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 1484-1489, 1993.

LIMA, G.; CURTIS, F.; CASTORIA, R.; CICCIO, V. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 341–349, 2003.

LIMA, I. G. P.; DUARTE, R. T. D.; FURLANETO, L.; BARONI, C. H.; FUNGARO, M. H. P.; FURLANETO, M.C. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, p. 631–636, 2006.

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

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

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

LORENZ, M. C. Genomic approaches to fungal pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, London. 5, p. 372-378, 2002.

LU, Z. X.; TOMBOLINI, R.; WOO, S.; ZEILINGER, S.; LORITO, M.; JANSSON, J.K. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3073–3081, 2004.

LÜBECK, M.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, B.; THRANE, U.; JANVIER, C.; JENSEN, D.F. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 815-826, 2002.

LUVIZOTTO, D. M. **Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 94p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MALINOWSKI, D. P., BELESKY, D. P. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 923–940, 2000.

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

MARCON, J. **Efeito de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre populações bacterianas**. 2007. 100p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARI, M.; TORRES, R.; CASALINI, L.; LAMARCA, N.; MANDRIN, J. F.; LICHOU, J.; LARENA, I.; DE CAL, M. A.; MELGAREJO, P.; USALL, J. Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 1271–1277, 2007.

MARTINO, E.; MURAT, C.; VALLINO, M.; BENA, A.; PEROTTO, S.; SPANU, P. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express EGFP during ericoid endosymbiosis. **Current Genetics**, Berlin, v. 52, p. 65-75, 2007.

MARUTHACHALAM, K.; NAIR, V.; RHO, H. S.; CHOI, J.; KIM, S.; LEE, Y. H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, p. 234-241, 2008.

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

MCCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 904-913, 2005.

MEJÍA, L. C.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ARNOLD, A.E.; BAEL, S.V.; SAMUELS, G.J.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 4–14, 2008.

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

- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7259-7267, 2007.
- MENG, Y.; PATEL, G.; HEIST, M.; BETTS, M. F.; TUCKER, S. L.; GALADIMA, N.; DONOFRIO, N. M.; BROWN, D.; MITCHELL, T. K.; LI, L.; XU, J. R.; ORBACH, M.; THON, M.; DEAN, R. A.; FARMAN, M. L. A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1050-1064, 2007.
- MES, J. J.; WIT, R.; TESTERINK, C. S.; DE GROOT, F.; HARING, M. A.; CORNELISSEN, B. J. C. Loss of avirulence and reduced pathogenicity of a gamma-irradiated mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 1131-1137, 1999.
- MICHIELSE, C.; HOOYKAAS, P.; VAN DEN HONDEL, C.; RAM, A. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1-17, 2005.
- MIGHELI, Q.; FRIARD, O.; DEL TEDESCO, D.; MUSSO, M. R.; GULLINO, M. L. Stability of transformed antagonistic *Fusarium oxysporum* strains *in vitro* and in soil microcosms. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 641-649, 1996.
- MIKKELSEN, L.; ROULUND, N.; LÜBECK, M.; FUNCK JENSEN, D. The perennial ryegrass endophyte *Neotyphodium lolii* genetically transformed with the green fluorescent protein gene (*gfp*) and visualization in the host plant. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 644-650, 2001.
- MIKKELSEN, L.; SARROCCO, S.; LÜBECK, M.; JENSEN, D. F. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, 223, p. 135-139, 2003.
- MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 83, p. 1354-1363, 2005.
- MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; NICOLÁS, C.; CARDOZA, R.E.; GUTIÉRREZ, S.; MONTE, E. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 1506-1513, 2008.
- MÜLLER, T.; BENJDIA, M.; AVOLIO, M.; VOIGT, B.; MENZEL, D.; PARDO, A.; FROMMER, W. B.; WIPF, D. Functional expression of the green fluorescent protein in the ectomycorrhizal model fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 437-442, 2006.

- MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 173-180, 2001.
- MULLINS, E. D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, p. 2043–2052, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 233, p. 1-9, 1992.
- NAKAYASHIKI, H.; NGUYEN, Q. B. RNA interference: roles in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, London v.11, p. 494-502, 2008.
- NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 97–108, 2005.
- NEVEU, B.; LABBÉ, C.; BÉLANGER, R. R. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: a case study with *Pseudozyma flocculosa*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam v. 68, p. 275-281, 2007.
- NEWCOMBE, G.; SHIPUNOV, A.; EIGENBRODE, S.D.; RAGHAVENDRA, A.K.H.; DING, H.; ANDERSON, C.L.; MENJIVAR, R.; CRAWFORD, M.; SCHWARZLÄNDER, M. Endophytes influence protection and growth of an invasive plant. **Communicative & Integrative Biology**, Austin, v. 2, p. 1-3, 2009.
- NEWELL, C. A. Plant transformation technology. Developments and applications. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 16, p. 53-65, 2000.
- O'CONNELL, R.; HERBERT, C.; SREENIVASAPRASAD, S.; KHATIB, M.; ESQUERRE´-TUGAYE´, M. T.; DUMAS, B. A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant–fungal interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 272–282, 2004.
- OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 284, p. 23–32, 2006.
- OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, v. 106–113, 2009.

- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 242, p. 205–215, 2002.
- OSONO, T. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. **Mycoscience**, Tokyo, v. 48, p. 47–52, 2007.
- PANACCIONE, D. G.; JOHNSON, R. D.; WANG, J.; YOUNG, C. A.; DAMRONGKOOL, P.; SCOTT, B.; SCHARDL, C. L. Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 12820–12825, 2001.
- PANTELIDES, I. S.; TJAMOS, S. E.; STRIGLIS, I. A.; CHATZIPAVLIDIS, I.; PAPLOMATAS, E. J. Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 30-36, 2009.
- PAPARU, P.; DUBOIS, T.; GOLD, C. S.; NIERE, B.; ADIPALA, E.; COYNE, D. Screenhouse and field persistence of nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* in *Musa* tissue culture plants. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 561–568, 2008.
- PARNISKE, M. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 414–421, 2004.
- PEREIRA, J. O.; CARNEIRO-VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 37-40, 1999.
- PERELLÓ, A., SIMON, M.R., ARAMBARRI, A.M. Interactions between foliar pathogens and the saprophytic microflora of the wheat (*Triticum aestivum* l.) phylloplane. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 232–243, 2002.
- PIECKENSTAIN, F. L.; BAZZALO, M. E.; ROBERTS, A. M. I.; UGALDE, R. A. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 77-84, 2001.
- POSADA, F.; VEGA, F. E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). **Mycologia**, Lancaster, v. 97, p. 1195–1200, 2005.
- QUECINE, M.C.; LACAVAL, P. T.; SILVA, M.C.P.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANIKLEINER, A. A. Expressing heterologous gene *cry* by endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* and its potential on biocontrol of *Diatraea saccharalis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54, 2008, Salvador. **Resumos...SBG**, 2008. p. 100.

QUESADA-MORAGA, E.; LANDA, B. B.; MUÑOZ-LEDESMA, J.; JIMÉNEZ-DIÁZ, R. M.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 161, p. 323–329, 2006.

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

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

REDMAN, R. S.; RANSON, J. C.; RODRIGUEZ, R. J. Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, p. 969–975, 1999.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS JR., F. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugarcane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 206, p. 205–211, 1999.

REYES-DOMINGUEZ, Y.; NARENDJA, F.; BERGER, H.; GALLMETZER, A.; FERNANDEZ-MARTIN, R.; GARCIA, I.; SCAZZOCCHIO, C.; STRAUSS, J. Nucleosome positioning and histone h3 acetylation are independent processes in the *Aspergillus nidulans* *prnD-prnB* bidirectional promoter. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 7, p. 656–663, 2008.

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

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

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

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

ROLLAND, S.; JOBIC, C.; FÈVRE, M.; BRUEL, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current Genetics**, Berlin, v. 44, p. 164–171, 2003.

ROMÃO, A. S.; ARAÚJO, W. L. Efeito do cultivo de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre a comunidade fúngica associada. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento*. Recife: UFPE, 2007. p. 150-159.

ROSSETO, P. B. **Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. 2008. 148p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SADAKA, N.; PONGE, J. F. Fungal colonization of phyllosphere and litter of *Quercus rotundifolia* Lam. in a holm oak forest (High Atlas, Morocco). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 9, p. 30–36, 2003.

SAIKKONEN, K. Forest structure and fungal endophytes. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 67–74, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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

SARROCCO, S.; MIKKELSEN, L.; VERGARA, M.; JENSEN, D. F.; LÜBECK, M.; VANNACCI, G. Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. **Mycological research**, Cambridge, v. 110, p. 179-187, 2006.

SCHÄFER, P.; KHATABI, B.; KOGEL, K. H. Root cell death and systemic effects of *Piriformospora indica*: a study on mutualism. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 275, p. 1-7, 2007.

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

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

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

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

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

SILVA, M. C. P. **Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*)**. 2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SIRRENBORG, A.; GÖBEL, C.; GROND, S.; CZEMPINSKI, N.; RATZINGER, A.; KARLOVSKY, P.; SANTOS, P.; FEUSSNER, I.; PAWLOWSKIA, K. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. **Physiologia Plantarum**, København, v. 131, p. 581–589, 2007.

SMITH S. A.; TANK D. C.; BOULANGER L. A.; BASCOM-SLACK, C. A.; EISENMAN, K.; et al. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, 2008. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0003052>. Acesso em: 20 fev. 2009.

SPIERING, M. J.; MOON, C. D.; WILKINSON, H. H.; SCHARDL, C. L. Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. **Genetics**, Bethesda, v. 169, p. 1403–1414, 2005.

St. LEGER, R. J., L. JOSHI, M. J. BIDOCHKA, AND D. W. ROBERTS. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 6349–6354, 1996.

STOHR, S. N.; DIGHTON, J. Effects of species diversity on establishment and coexistence: a phylloplane fungal community model system. **Microbial Ecology**, New York, v. 48, p. 431–438, 2004.

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

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

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

TOOLEY PW, LEUNG H, LEONG SA. Meiotic and mitotic stability of transforming DNA in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Current Genetics**, Berlin, v. 21, p. 55-60, 1992.

TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAIISHI, T.; KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, p. 230–239, 2003.

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

USUKI, F.; NARISAWA, K.; YONEZAWA, M.; KAKISHIMA, M.; HASHIBA, T. An efficient inoculation method for colonization of chinese cabbage seedlings by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 68, p. 326-332, 2002.

VALÈ, G.; ARAGONA, M.; TORRIGIANI, E.; CATTIVELLI, L.; MONTIGIANI, M.; PORTA-PUGLIA, A. Characterization of a hypovirulent insertional mutant of *Pyrenophora graminea* and analysis of the barley defence response after inoculation. **Plant Pathology**, London, v. 47, p. 657-664, 1998.

VAN DER GRAAFF, E.; DEN DULK-RAS, A.; HOOYKAAS, P. J. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht v. 31, p. 677-681, 1996.

VETTING, M. W.; CARVALHO, L. P. S.; YU, M.; HEGDE, S. S.; MAGNET, S.; RODERICK, S. L.; BLANCHARD, J. S. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 433, p. 212–226, 2005.

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

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 57, p. 1381-1386, 2005.

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

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

WELD, R. J.; PLUMMER, K. M.; CARPENTER, M. A.; RIDGWAY, H. J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. **Cell Research**, Hong Kong, v. 16, p. 31-44, 2006.

WHITE, D.; CHEN, W. Genetic transformation of *Ascochyta rabiei* using *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, Berlin, v. 49, p. 272–280, 2006.

WICKLOW, D. T.; POLING, S. M. Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 109-115, 2009.

WIRSEL, S. G. R.; LEIBINGER, W.; ERNST, M.; MENDGEN, K. Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. **New Phytologist**, London, v. 149, p. 589–598, 2001.

WITTIG, H. P. P.; JOHNSON, K. B.; PSCHIEDT, J. W. Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 383-387, 1997.

ZHANG, L.; YANG, J.; NIU, Q.; ZHAO, X.; YE, F.; LIANG, L.; ZHANG, K.-Q. Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 78, p. 983–990, 2008.

ZHANG, N.; SCOTT, V.; AL-SAMARRAI, T. H.; TAN, Y. Y.; SPIERING, M. J.; MCMILLAN, L. K.; LANE, G. A.; SCOTT, D. B.; CHRISTENSEN, M. J.; SCHMID, J. Transformation of the ryegrass endophyte *Neotyphodium lolii* can alter its *in planta* mycelial morphology. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 601-611, 2006.

ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, X. Epicoccins A–D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, p. 1522–1525, 2007.

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

ZHOU, T.; REELEDER, R. D. Colonization of bean flowers by *Epicoccum purpurascens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 774-778, 1991.

4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Epicoccum* spp. E MUTAGÊNESE INSERCIONAL ALEATÓRIA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Resumo

Os fungos são considerados uma fonte importante de compostos bioativos com aplicação agroquímica e farmacêutica. Nos últimos anos, tem surgido um grande interesse pelos fungos endofíticos devido a estudos compreensivos que revelaram que mais de 50% dos compostos isolados destes fungos apresentavam estruturas previamente desconhecidas. Uma das questões que permeiam os programas de *screening* microbiano é como aumentar as chances de encontrar novos metabólitos. Uma abordagem que pode ser considerada envolve a determinação da diversidade genética e metabólica que existe dentro dos indivíduos de uma determinada espécie. Estudos anteriores demonstraram que o fungo *Epicoccum nigrum* é comumente isolado como endofítico dos tecidos de cana-de-açúcar e que extensa variação genética pode ser encontrada entre isolados de um único local e hospedeiro. Esta espécie é conhecida por sua atividade de biocontrole e produção de metabólitos secundários diversos. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de isolados endofíticos de *Epicoccum* spp. contra diferentes fitopatógenos e patógenos humanos; 2) comparar a diversidade fisiológica com a variação genética previamente estudada para este mesmo grupo de isolados; 3) obter e caracterizar uma biblioteca de agrotransformantes, visando a identificação de genes envolvidos na atividade antimicrobiana de *Epicoccum* spp. Os resultados obtidos com base em três metodologias distintas mostraram que dependendo da abordagem utilizada a atividade antimicrobiana de diferentes isolados pode ser subestimada. Cerca de 30,36% das linhagens avaliadas inibiram todos os microrganismos patogênicos testados, independentemente do método utilizado para determinação da atividade biológica. Isto demonstra a importância da avaliação de diferentes linhagens em programas de *screening* de produtos naturais bioativos, de modo a garantir o máximo de informação possível sobre os isolados de uma determinada espécie. De modo geral, extensa variação da atividade antimicrobiana foi verificada entre as linhagens, a qual foi correlacionada com a variação genética estudada previamente por marcadores AFLP e seqüências de ITS. Uma biblioteca de 832 agrotransformantes foi obtida e caracterizada quanto à perda da atividade antimicrobiana. Esta caracterização permitiu identificar 128 transformantes que perderam a atividade inibitória contra todos os patógenos testados. A análise das seqüências flanqueadoras do T-DNA revelou que de 41 mutantes que produziram produtos de amplificação únicos por meio de TAIL-PCR, 73,17% apresentaram inserção de seqüências do vetor binário adjacente às bordas do T-DNA. Para os 11 mutantes restantes, foi verificada elevada similaridade com proteínas hipotéticas de fungos, algumas sem função conhecida, e outras contendo domínios conservados envolvidos em diferentes funções celulares, como regulação da expressão gênica, transporte, obtenção de energia e outras funções enzimáticas. A análise do extrato orgânico por meio de bioautografia revelou a perda da atividade antimicrobiana de alguns mutantes insercionais, em comparação ao extrato da linhagem selvagem. O grande número de mutantes obtidos e caracterizados constitui uma ferramenta importante para o estudo molecular do metabolismo secundário deste fungo endofítico, auxiliando o entendimento da biossíntese de diversos compostos com estruturas complexas produzidos por esta espécie.

Palavras-chave: Endofítico; Antagonismo; Metabólitos secundários; Mutagênese insercional aleatória mediada por *Agrobacterium tumefaciens*; Variabilidade fisiológica; AFLP

4 ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ENDHOPHYTIC ISOLATES OF *Epicoccum* spp. AND *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED RANDOM INSERTIONAL MUTAGENESIS

Abstract

Fungi are considered an important source of bioactive compounds with pharmaceutical and agrochemical applications. In recent years, there has arisen a great interest in endophytic fungi due to comprehensive studies that revealed that over 50% of their isolated compounds were previously unknown structures. One important issue in microbial screening program is how to improve the chances of finding new metabolites. An approach that should be considered is the determination of metabolic and genetic diversity within species. Previous studies have shown that the fungus *Epicoccum nigrum* is commonly isolated as endophytic in sugarcane and an extensive genetic variation can be found among isolates from a single location and host. This fungus is known for its uses as biological control agent and production of a range of secondary metabolites. In this context, the objectives of this study were: 1) to evaluate the in vitro antimicrobial activity of endophytic isolates of *Epicoccum* spp. against several phytopathogens as well as against human pathogens; 2) to compare the physiological diversity to genetic variation for this group of *Epicoccum* spp. isolates, 3) to obtain and characterize a *Agrobacterium*-mediated insertional library, to identification of genes involved in antimicrobial pathways in *Epicoccum* spp. The results of three different methods showed that antimicrobial activity might be underestimated for some isolates depending on method. Regardless of which method was used, approximately 30% of all strains inhibited the pathogenic microorganisms. This demonstrates the importance of evaluate different lineages in screening programs to guarantee the maximum information on the metabolic diversity of a specie. In general, a wide range antimicrobial activity was observed between isolates, and it was correlated with the genetic variation studied by AFLP markers and ITS. A library of 832 insertional mutants was obtained and the mutants were screened for a lack in antimicrobial activity. 128 transformants were not able inhibit all the pathogens tested. The T-DNA flank region sequencing revealed that from 41 mutants that produced amplification products by tail-PCR, 73.17% had insertion of the vector sequences adjacent to the edges of the binary T-DNA. For the 11 remaining mutants it was possible to identify with high similarity hypothetical proteins from fungi, some of them with unknown function, and other domains involved in several cellular functions such as gene expression regulation, transport, energetic metabolism and other enzymatic functions. The analysis of the organic extract by bioautography reveled the lack antimicrobial activity of some of the mutants in comparison to the extract of the wild strain. The large number of mutants obtained and characterized in this work is an important tool for the molecular study of the secondary metabolism of this endophytic fungus, and could facilitate the understanding of the biosynthesis of several compounds with complex structures produced by this species.

Keywords: Endophytic; Antagonism; Secondary metabolites, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated random insertional mutagenesis; Physiological variability; AFLP

4.1 Introdução

Os fungos são considerados uma fonte importante de compostos bioativos com aplicação agroquímica e farmacêutica. Nos últimos anos, muitos estudos têm levado à caracterização das vias de biossíntese de metabólitos secundários de fungos filamentosos. Este esforço tem levado à descoberta de novos compostos, novos clusters gênicos e enzimas chave, e tem sido grandemente suportado pela recente e crescente liberação de seqüências genômicas de fungos (COLLEMARE et al., 2008). Interessantemente, as análises genômicas de inúmeros fungos têm revelado que o número previsto de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários excede o número de metabólitos que são detectáveis em uma determinada espécie em condições padrões de fermentação (BRAKHAGE et al., 2008; BERGMANN et al., 2007). Estas descobertas abrem a possibilidade de manipulação genética para induzir a expressão de genes silenciosos contribuindo para identificação de novos metabólitos com atividade biológica, como demonstrado recentemente para *Aspergillus nidulans* (BERGMANN et al., 2007).

Os metabólitos secundários de fungos podem incluir compostos contaminantes de alimentos que são tóxicos para animais tais como as micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (BENNETT; KLICH, 2003). Muitos metabólitos secundários agem como fatores de patogenicidade para plantas, como é o caso das toxinas seletivas ao hospedeiro (HST) produzidas por espécies como *Cochliobolus heterostrophus* e *Alternaria alternata* (MARKHAM; HILLE, 2001). A virulência de vários fungos fitopatogênicos também é mediada por sideróforos, uma classe de metabólitos secundários envolvida na captação de ferro do ambiente (FOX; HOWLETT, 2008). Ao contrário dos efeitos tóxicos, metabólitos secundários de fungos também são reconhecidos pelos seus efeitos benéficos, representados por agentes imunossupressores tais como ciclosporina A e pelo agente redutor dos níveis de colesterol lovastatina, produzido por *A. terreus* (DREYFUSS; CHAPELA, 1994; LANGLEY, 1997).

Entretanto, a função dos metabólitos secundários na biologia de fungos filamentosos ainda não é totalmente compreendida. Uma vantagem da produção desses metabólitos é que eles permitem aos organismos que os produzem sobreviver no seu nicho ecológico. Muitos fungos vivem saprofiticamente em diferentes tipos de substratos onde são expostos a diversos organismos competidores (FOX; HOWLETT, 2008). Os fungos devem regular a síntese de metabólitos, provavelmente para garantir que a energia e os precursores usados na sua síntese

sejam gastos somente em condições ambientais onde tais compostos sejam vantajosos (BILLS et al., 2008). Um dos metabólitos mais estudados de fungos é o policetídeo DHN, o qual é precursor da melanina. Este pigmento é impregnado nas paredes celulares dos fungos e está envolvido na proteção do micélio e dos esporos contra dessecação, oxigênio e UV (HENSON; BUTLER; DAY, 1999; LANGFELDER et al. 2003). A melanina é necessária para geração da pressão de turgor em estruturas de infecção (apressórios) envolvidas na penetração no tecido hospedeiro por espécies fitopatogênicas como *Magnaporthe* e *Colletotrichum* (COLLEMARE et al., 2008). Estudos também têm revelado a existência de uma associação entre a produção de metabólitos secundários e processos de diferenciação morfológica em fungos, como por exemplo, durante a fase de reprodução sexuada ou assexuada (CALVO et al., 2002; BAYRAM et al., 2008).

Os genes que codificam muitas das enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários são geralmente agrupados no genoma de fungos. Os metabólitos secundários de fungos podem ser classificados em policetídeos, peptídeos não ribossômicos, terpenos ou alcalóides, e são sintetizados, respectivamente, por policetídeo sintases (PKS), peptídeo sintases não ribossômicas (NRPS), terpeno ciclases (TS), e dimetilalil difosfato triptofano sintases (DMATS) (COLLEMARE et al., 2008). Os substratos para as enzimas PKS e NRPS são, respectivamente, moléculas de acil coenzima A e aminoácidos (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). Os substratos da enzima TS são unidades de dimetilalil difosfato (ou isoprenos), enquanto que os alcalóides são produzidos a partir do triptofano e de unidades de isopreno (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). Em fungos, as enzimas PKS são principalmente do tipo I e contêm vários domínios utilizados interativamente para alongar o esqueleto policetídeo. As enzimas NRPS são enzimas multifuncionais compostas de módulos enzimáticos utilizados de modo não interativo para alongar uma cadeia de aminoácidos (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; COLLEMARE et al., 2008).

A importância dos fungos como fonte de produtos naturais biologicamente ativos é ilustrada pelo fato de que 6 das 20 drogas melhor vendidas em 1995 foram de origem fúngica. Além disso, de aproximadamente 520 novos fármacos aprovados para uso entre 1983 e 1994, 39% foram produtos naturais, ou foram derivados de produtos naturais (LANGLEY, 1997; WILDMAN, 2003). Nesse contexto, nos últimos anos o interesse pelos fungos endofíticos como potenciais produtores de novos compostos tem aumentado como consequência de estudos compreensivos que indicaram que mais que 50% das substâncias biologicamente ativas isoladas

de fungos endofíticos eram previamente desconhecidas (SCHULZ et al., 2002). Como enfatizado por Strobel e Daisy (2003), de aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes, somente poucas têm sido estudadas quanto à presença de microrganismos endofíticos. Conseqüentemente, a oportunidade de encontrar novas espécies de fungos e atividades biológicas entre a diversidade de plantas em diferentes ecossistemas é grande. A diversidade química de fungos endofíticos é ampla (TAN; ZOU, 2001; STROBEL; DAISY, 2003; GUNATILAKA, 2006; ZHANG; SONG; TAN, 2006) e inclui substâncias de interesse para agricultura, indústria e medicina, como compostos antimicrobianos, antivirais, anticâncer, antioxidantes e outras atividades.

Um aspecto importante para identificação de produtos naturais de fungos é o processo de seleção inicial. É conhecido que novas espécies podem produzir novas moléculas com diferentes atividades biológicas (FISCHER; ANKE; STERNER, 1995; BRILL et al., 1996), mas também linhagens específicas de fungos bastante estudados podem produzir novos metabólitos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994), como exemplificado pela descoberta da lovastatina a partir de *A. terreus* (VAGELLOS, 1991). A cada ano um grande número de espécies é selecionado a partir de diferentes habitat e regiões, de modo um tanto quanto aleatório (WILDMAN, 1995; PELÁEZ et al., 1998; SCHULZ et al., 2002; VITA-MARQUES et al., 2008). Uma das questões que permeiam os programas de *screening* microbiano é como aumentar as chances de encontrar novos metabólitos. Por exemplo, quantos isolados de uma determinada espécie devem ser avaliados, ou quantas espécies de um determinado local ou ambiente devem ser investigadas (TALBOT; VINCENT; WILDMAN, 1996). Além disso, é amplamente reconhecido que a produção de metabólitos secundários por fungos é influenciada pelas condições de cultivo, como meio de cultura, período de cultivo, pH, luminosidade, temperatura, aeração entre outros (BILLS et al., 2008). Nesse aspecto, outra questão bastante debatida em programas de *screening* microbiano é se maior esforço deve ser aplicado para *screening* de maior biodiversidade ou maior número de parâmetros fisiológicos (BILLS et al., 2008). De modo geral, ambas as abordagens têm sido utilizadas e os resultados são promissores (BILLS et al., 2008; SCHULZ et al., 2002).

Além da análise de um grande número de espécies fúngicas de diferentes habitat e regiões (DREYFUSS; CHAPELA, 1994; GLOER, 1995; PELÁEZ et al., 1998; SCHULZ et al., 2002; WEBER et al., 2007; VITA-MARQUES et al., 2008) outra estratégia possível para identificar novos metabólitos secundários em fungos, a qual não tem sido efetivamente investigada, envolve o desenvolvimento de métodos que maximizem a diversidade genética dos organismos que são

analisados quanto à produção de compostos naturais. Por exemplo, isso pode ser acessado por meio da determinação da diversidade genética e metabólica que existe dentro dos indivíduos de uma determinada espécie (MÖLLER, WEBER, DREYFUSS, 1996; TALBOT; VINCENT; WILDMAN, 1996; SEYMOUR et al., 2004).

Em recente análise das comunidades microbianas endofíticas associadas à *Saccharum officinarum*, tem sido observado que o fungo *Epicoccum nigrum* é consistentemente isolado como endofítico dos tecidos dessa planta (STUART, 2006; ROMÃO; ARAÚJO, 2007; MENDES, 2008). Este gênero apresenta metabolismo secundário altamente desenvolvido e diverso, como demonstrado pela descoberta de compostos com diferentes atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, antiviral, citotóxica, bem como diferentes pigmentos de interesse para indústria de alimentos e compostos fluorescentes (GRIBANOVSKI-SASSU; FOPPEN, 1967; BAHRIM; ŞOPTICĂ, 2004; MAPARI; MEYER; THRANE, 2008; ŞOPTICĂ; BAHRIM, 2005; BLEOJU; GONZÁLEZ SANJOSÉ, 2007; BELL; KARUSO, 2003; CHOI; VEAL; KARUSO, 2006; BAUTE et al., 1978; ZHANG et al., 2007; KEMAMI WANGUN; HERTWECK, 2007; BAMFORD; NORRIS; WARD, 1961; IKAWA et al., 1978; ABDEL-LATEFF et al., 2003; KEMAMI WANGUN; ISHIDA; HERTWECK, 2008; WANGUN; DAHSE; HERTWECK, 2007; WRIGHT; OSTERHAGE; KÖNIG, 2003).

Apesar do potencial biotecnológico, não há estudos sobre os mecanismos genéticos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários bioativos por este fungo. Conforme apresentado no capítulo 2, extensa variação genética foi detectada em uma coleção de isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar e de outros hospedeiros, bem como diferenças fisiológicas e morfológicas. Nesse contexto, para melhor caracterização do potencial biotecnológico desse fungo, o presente capítulo teve por objetivos avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes isolados de *Epicoccum* e comparar esta atividade com os dados moleculares de marcadores AFLP e de seqüências de ITS obtidos previamente. Além de verificar se existe correlação entre diversidade genética e atividade antimicrobiana, um segundo objetivo deste trabalho foi utilizar uma abordagem de mutagênese insercional aleatória mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para geração de uma biblioteca de agrotransformantes, visando à identificação de genes envolvidos na síntese de compostos antimicrobianos por este fungo endofítico. Análises bioquímicas preliminares de alguns mutantes que perderam a atividade antimicrobiana também são apresentadas.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Linhagens e condições de cultivo

Os isolados endofíticos de *Epicoccum* avaliados neste trabalho foram previamente obtidos dos tecidos internos de *Saccharum officinarum* e de outros hospedeiros (Tabela 4.1). Estes isolados representam uma amostra (56 isolados) de um grande grupo de linhagens caracterizadas previamente quanto à variabilidade genética por diferentes marcadores moleculares (capítulo 2). Os isolados foram mantidos em meio de cultura BDA (Difco). Para os experimentos de mutagênese insercional aleatória mediada por *A. tumefaciens*, foram utilizadas as linhagens P16 e TH2, de *E. nigrum* e *Epicoccum* sp., respectivamente. Os microrganismos fitopatogênicos utilizados nos testes de antagonismo e inibição *in vitro* foram: os fitopatógenos de cana-de-açúcar *Fusarium verticillioides*, *Ceratocystis paradoxa* e *Colletotrichum falcatum*, bem como o oomiceto patogênico de *Citrus*, *Phytophthora* sp., os quais foram mantidos em meio de cultura BDA (Difco). Também foi utilizada a bactéria *Xanthomonas albilineans*, patogênica de cana-de-açúcar, a qual foi mantida em meio de cultura NA (Difco). Os microrganismos patogênicos humanos utilizados nos testes de inibição *in vitro* foram: as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*, as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e a levedura *Candida albicans*. *E. coli* e *S. aureus* foram mantidas em meio de cultura Luria-Bertani, *B. subtilis* e *M. luteus* foram mantidas em meio de cultura TSB (Difco) e *C. albicans* foi mantida em meio de cultura BDA (Difco). Todos os microrganismos fitopatogênicos e patógenos humanos foram obtidos a partir do banco de linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, Departamento de Genética, Esalq/USP, Piracicaba, São Paulo.

4.2.1.2 Ensaio de antagonismo contra fungos fitopatogênicos

A atividade antagonista contra os fungos fitopatogênicos de cana-de-açúcar *F. verticillioides* e *C. paradoxa* foi avaliada pelo método da cultura pareada, o qual consiste no confronto direto, em meio sólido, do antagonista (endófito) e do fungo fitopatogênico (MARIANO, 1993). Para tanto, as linhagens dos endófitos e dos patógenos foram cultivadas por

Tabela 4.1 – Linhagens endofíticas de *Epicoccum* avaliadas no presente trabalho

(continua)

Linhagens	Hospedeiro	Origem	Referência
CBS31883 ^(a)	Solo sob <i>Saccharum officinarum</i>	-	-
1F4	Folhas de videira (<i>Vitis labrusca</i>)	Jundiaí (SP)	Brum (2008)
1F15	Folhas de videira (<i>Vitis labrusca</i>)	Jundiaí (SP)	Brum (2008)
Ep1M*	Folhas de macieira	Caxias do Sul (RS)	Camatti-Sartori et al. (2005)
EpAr*	Folhas de arroz (<i>Oriza sativa</i>)	Lavras (MG)	-
Ep1sc*	Cariopses (semente) de cana-de-açúcar	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
Ep2sc*	Cariopses (semente) de cana-de-açúcar	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
63Ep	Folhas var. SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Romão et al. (2006)
79Ep	Rizosfera var. SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Romão et al. (2006)
62Ep	Folhas var. SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Romão et al. (2006)
TH21Ep	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TC1	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TH1*	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TH2	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TC41	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TC41F*	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TC42F	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TH31B	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TC42A	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P82	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P81	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TH13A	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TH13B	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TC2	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P104	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P33	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
TH41Ep	Folhas var.SP80-1842 IMI-01(transgênica)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
SP1	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
SP2	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P11	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P12	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P16	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P17	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P98	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C33Ep	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE2	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE3	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE5	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE51	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE6	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE7*	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE9	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE10	Folhas var. SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE11	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE12	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE13*	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE16	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE18	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE24	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE25*	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE27	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE29	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CE39	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2

Tabela 4.1 – Linhagens endofíticas de *Epicoccum* avaliadas no presente trabalho

(conclusão)

Linhagens	Hospedeiro	Origem	Referência
CV2	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
CV3	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C12A	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C13A	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C13B	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C41A	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C41B	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C42A*	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C42B*	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C22B	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P13	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P92	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C12C	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P912	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P18*	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
P14*	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2
C41Ep*	Folhas var.SP80-1842 (convencional)	Piracicaba (SP)	Capítulo 2

(a) Linhagem utilizada como referência, CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands.

(*) As linhagens assinaladas com asterisco não foram avaliadas quanto à capacidade de antagonismo frente a diferentes microrganismos patogênicos, mas foram avaliadas por marcadores AFLP ou por análise filogenética com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico em um estudo realizado anteriormente e mostrado no capítulo 2 desta tese. Estas linhagens estão representadas em um dendrograma mostrado adiante neste trabalho, o qual serviu de base para comparação com os dados fisiológicos que serão discutidos ao longo deste capítulo.

7 dias a 28°C na ausência de luz em meio de cultura BDA (200g de batata cozida, 20g de glicose, 15g de agar, 1000 mL de água destilada, pH 6,8). Posteriormente, discos de micélio de 6 mm de diâmetro provenientes das zonas de crescimento ativo das colônias dos endófitos foram transferidos para a margem de placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura BDA. As placas foram incubadas por 48 horas a 28°C na ausência de luz, e posteriormente, discos de micélio dos fitopatógenos foram inoculados a uma distância de 5 cm das colônias dos endófitos. As placas controle consistiram na inoculação apenas dos patógenos. Após 5 dias de incubação a 28°C, foram realizadas mensurações do tamanho da zona de inibição entre as colônias pareadas e a porcentagem de inibição do crescimento radial dos patógenos foi calculada, em relação ao controle.

Para acessar a estabilidade das zonas de inibição, as placas que apresentaram reações de antagonismo foram reavaliadas após 20 dias de cultivo. Os testes de pareamento foram realizados em triplicata, em um delineamento inteiramente casualizado, e os dados das mensurações das zonas de inibição bem como do crescimento radial dos patógenos foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância, com auxílio do software SAS (Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.2.1.3 Ensaios de antagonismo contra bactérias e leveduras patogênicas

Diferentes métodos qualitativos e quantitativos podem ser utilizados para investigar a atividade antimicrobiana de fungos filamentosos, os quais são baseados na interação direta entre os microrganismos, ou na atividade do meio de fermentação das linhagens (MARIANO, 1993). A avaliação da capacidade inibitória de linhagens endofíticas de *E. nigrum* e *Epicoccum* sp. contra diferentes bactérias fitopatogênicas e patogênicas humanas e contra a levedura *C. albicans* foi realizada utilizando a metodologia modificada de difusão em ágar com sobrecamada de meio semi-sólido, descrita por Spelhaug e Harlander (1989), bem como a metodologia modificada de blocos de ágar, proposta por Ichikawa et al. (1971).

4.2.1.3.1 Metodologia de blocos de ágar, modificada de Ichikawa et al. (1971)

Inicialmente as linhagens endofíticas de *Epicoccum* foram cultivadas durante 15 dias em placas de petri contendo 15 mL de meio de cultura BDA a 28°C e na ausência de luz. O preparo das culturas bacterianas se deu pela inoculação de colônias isoladas em 10 mL de meio de cultura NA (3g de extrato de carne; 5g de peptona; 1000 mL de água destilada; pH 6,8) e Luria-Bertani líquido, para *X. albilineans* e *E. coli*, respectivamente, as quais foram incubadas durante 18 horas a 37°C sob agitação constante (100 rpm). Após este período, uma alíquota de 50 µL destas culturas foi semeada em placas contendo 15 mL dos respectivos meios de cultura. Em seguida, discos de 8 mm de diâmetro foram recortados das colônias de *Epicoccum* e transferidos para a superfície das placas contendo as bactérias patogênicas previamente inoculadas, de modo que a superfície contendo micélio ficasse voltada para cima. As placas foram armazenadas durante 8 horas a 4°C para permitir a difusão dos metabólitos de *Epicoccum* para o meio de cultura das bactérias (FERMOR; WOOD, 1981; ISHIKAWA; KASUYA; VANETTI, 2001), e em seguida incubadas a 37°C por 18 horas.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio da mensuração do diâmetro do halo de inibição ao redor dos blocos de ágar contendo o micélio dos fungos endofíticos. O controle consistiu na inoculação apenas de discos de BDA. Para acessar a estabilidade da zona de inibição, as placas que apresentaram reações de antagonismo foram reavaliadas após 10 dias de cultivo. O bioensaio foi realizado em triplicata, em um delineamento inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de significância, com auxílio do software SAS (Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.2.1.3.2 Metodologia de difusão em ágar, modificada de Spelhaug e Harlander (1989)

Para o ensaio por meio de teste de difusão em ágar com sobrecamada de meio semi-sólido, pequenos fragmentos de micélio, provenientes de culturas de *Epicoccum* crescidas durante 7 dias em meio BDA a 28°C na ausência de luz, foram transferidos com auxílio de palitos esterilizados para placas de Petri (150 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura BDA (4 linhagens em cada placa). As placas foram incubadas por 72 horas a 28°C na ausência de luz. A preparação das culturas dos microrganismos patogênicos se deu por meio da inoculação de colônias isoladas em 10 mL de meio de cultura líquido, seguida de incubação por 18 horas a 37°C sob agitação constante (100 rpm). *E. coli* e *S. aureus* foram crescidas em meio de cultura Luria-Bertani, *B. subtilis* e *M. luteus* foram crescidas em TSB (Difco), *X. albilineans* foi crescida em NA e para *C. albicans* foi utilizado o meio de cultura caldo batata (mesmo meio BDA sem a adição de ágar). Após o período de crescimento, alíquotas de cada microrganismo-teste foram transferidas para os respectivos meios de cultura semi-sólidos (0,5% de ágar, p/v), pré-aquecidos a 45°C-50°C, na proporção de 1 mL de cultura para cada 100 mL de meio semi-sólido. O meio de cultura semi-sólido contendo os microrganismos patogênicos foi vertido (15 mL) sobre as culturas de *Epicoccum* preparadas anteriormente. As placas foram armazenadas por um período de 8 horas a 4°C para permitir a difusão dos metabólitos das culturas de *Epicoccum* para a sobrecamada de meio de cultura dos patógenos (FERMOR; WOOD, 1981; ISHIKAWA; KASUYA; VANETTI, 2001), e em seguida incubadas a 37°C por 18-24 horas. A atividade inibitória foi determinada pela mensuração do tamanho da zona de inibição ao redor das colônias dos endófitos. O bioensaio foi realizado em triplicata, em um delineamento inteiramente casualizado e os dados foram analisados pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

4.2.1.4 Crescimento das linhagens endofíticas de *Epicoccum* em cultura submersa e obtenção dos extratos orgânicos em pequena escala

As linhagens que mostraram maior atividade antimicrobiana nos testes anteriores foram cultivadas em pequena escala em meio líquido para extração de metabólitos ativos. Para isso, 3 discos de micélio de 8 mm de diâmetro, provenientes de culturas crescidas em BDA durante 7 dias a 28°C na ausência de luz, foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura caldo batata acrescido de 2% de extrato de levedura. Os frascos foram incubados a 28°C na ausência de luz e em cultivo estático durante 45 dias. Após o crescimento, o

micélio e o meio fermentativo foram separados por filtração a vácuo e armazenados em recipientes separados. A extração de metabólitos foi realizada tanto a partir do meio de cultura das linhagens quanto a partir do micélio. Para a extração dos metabólitos a partir do meio de fermentação, o filtrado dos fungos foi submetido a três etapas seguidas de extração com o solvente orgânico acetato de etila. Para tanto, o solvente e o filtrado dos fungos foram misturados na proporção 1:3 (v/v), agitados por alguns minutos e em seguida as fases aquosa e orgânica foram separadas em funil de separação. A fase orgânica foi coletada e armazenada em recipiente separado. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, e em seguida a fase orgânica foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, no Laboratório de Genética de Leveduras, Departamento de Genética, Esalq/USP. O rendimento do extrato bruto foi posteriormente calculado. O extrato obtido a partir do meio de cultura não inoculado com os fungos foi utilizado como controle. A extração de metabólitos a partir do micélio foi realizada pela imersão da massa micelial separada anteriormente em frascos contendo 100 mL do solvente diclorometano. Estes frascos foram deixados em repouso à temperatura ambiente por 48 horas e em seguida o solvente orgânico foi coletado por filtração e armazenado em recipiente separado. A massa micelial foi novamente imersa, dessa vez em uma mistura de 100 mL diclorometano e metanol (na proporção de 1:1), e deixada em repouso por 48 horas, e posteriormente somente em metanol, por mais 48 horas (MAKI, 2006). Após as três extrações, o volume de 300 mL dos solventes orgânicos foi concentrado em evaporador rotativo e o rendimento do extrato bruto diclorometano/metanol foi posteriormente calculado. Este extrato foi armazenado para análises futuras, e no presente capítulo será mostrado o resultado da análise do extrato de acetato de etila.

4.2.1.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de linhagens endofíticas de *Epicoccum* obtidos em pequena escala

A atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *Epicoccum* foi avaliada pelo método de difusão em ágar com discos de papel filtro. Para isso, a concentração do extrato de acetato de etila foi ajustada para 100 mg.mL^{-1} em dimetilsulfóxido (DMSO). O efeito do aquecimento durante 1 hora a 100°C sobre a atividade biológica dos extratos também foi investigado. Aliquotas de $20 \mu\text{L}$ dos extratos tratados e não tratados com aquecimento foram inoculadas em discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro dispostos sobre a superfície de placas de Petri contendo meio de cultura inoculado com as bactérias patogênicas, e também com a levedura *C.*

albicans, conforme descrito anteriormente. O controle consistiu na inoculação somente de DMSO. Para fins de comparação, foram inoculadas alíquotas de 20 μL dos antibióticos estreptomicina (Sigma), espectinomicina (Sigma), rifampicina (Sigma) e higromicina (Invitrogen, Brasil), em concentrações estoque de 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As placas foram armazenadas durante 8 horas em refrigerador para permitir a difusão dos metabólitos para o meio de cultura dos patógenos, e em seguida incubadas a 37°C por 18 horas. A mensuração do diâmetro dos halos de inibição foi realizada em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de uma régua milimetrada. O bioensaio foi realizado em triplicata e os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância.

O extrato orgânico de acetato de etila também foi testado contra os fungos fitopatogênicos *F. verticillioides*, *C. paradoxa*, *C. falcatum* e contra o oomiceto *Phytophthora* sp. Para tanto, pequenos fragmentos miceliais, provenientes de culturas dos patógenos crescidas durante 7 dias em meio de cultura BDA (Difco), foram inoculados com auxílio de palitos esterilizados no centro de placas de Petri (60 x 15 mm) contendo 5 mL de meio de cultura BDA (Difco) acrescidos de concentrações crescentes do extrato orgânico de acetato de etila (solução estoque de 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em DMSO). O diâmetro das colônias foi medido em dois sentidos perpendiculares com auxílio de uma régua milimetrada após 4 dias de incubação a 28°C. Também foram preparadas placas contendo somente DMSO. O bioensaio foi realizado em triplicata e os dados dos diâmetros das colônias foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de significância.

4.2.1.5 Cultivo em grande escala, determinação do perfil cromatográfico e bioautografia

A linhagem P16 de *E. nigrum* foi escolhida para o cultivo em grande escala e extração dos metabólitos secundários. Em colaboração com a Prof^a. Anita Marsaioli (Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo) os extratos de *E. nigrum* serão futuramente submetidos ao fracionamento guiado por testes biológicos para determinação dos compostos antimicrobianos. No presente capítulo será mostrado alguns ensaios iniciais com o extrato da linhagem P16 de *E. nigrum*, como por exemplo, escolha do sistema de solventes adequado para separação dos compostos por cromatografia de camada delgada e ensaios preliminares por meio de bioautografia.

Cultivo em grande escala: Frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio de cultura caldo batata, acrescido de 2% de extrato de levedura, foram inoculados com 10 discos miceliais de 8 mm de diâmetro da linhagem P16 de *E. nigrum*, provenientes de culturas crescidas

durante 7 dias em meio de cultura BDA. Os frascos (totalizando 9 litros) foram incubados a 28°C na ausência de luz durante 60 dias, em cultivo estático, no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, Dept. de Genética, Esalq/USP.

Obtenção dos extratos orgânicos: Após o período de crescimento, a extração dos metabólitos foi realizada no Departamento de Química, Instituto de Química, Unicamp, São Paulo. As culturas foram filtradas a vácuo e o micélio foi liofilizado. O meio de fermentação foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. Cada litro da cultura foi submetido à extração por 4 vezes seguidas, com 300 mL de acetato de etila a cada extração, sendo que o solvente foi reaproveitado após cada etapa de evaporação em evaporador rotativo. Após as extrações, a fase aquosa foi armazenada separadamente e a fase orgânica foi misturada com sulfato de sódio anidro, para secagem da porção aquosa residual. Após filtração, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e o rendimento final foi calculado. Após a extração com acetato de etila, a fase aquosa restante foi novamente submetida à extração, dessa vez com o solvente *n*-butanol. Neste caso, cada litro do meio fermentado foi extraído por 3 vezes consecutivas, com 300 mL de *n*-butanol a cada extração, sendo que o solvente foi reaproveitado, conforme descrito anteriormente. A fase orgânica resultante foi filtrada, evaporada em evaporador rotativo e o rendimento do extrato foi calculado. O micélio liofilizado foi submetido à extração com metanol e o extrato foi armazenado para análises posteriores. No presente trabalho será mostrado o resultado inicial obtido com o extrato aceto etílico. Os demais extratos serão analisados futuramente no Departamento de Química da Unicamp.

Determinação do perfil cromatográfico por cromatografia de camada delgada: O perfil cromatográfico do extrato de acetato de etila da linhagem P16 foi determinado por CCD. Diferentes sistemas de solventes e reveladores químicos foram utilizados, a fim de encontrar a melhor combinação para separação dos metabólitos e posterior análise antimicrobiana por bioautografia. As seguintes combinações de eluentes foram testadas: clorofórmio:metanol (9:1); clorofórmio:metanol (7:3); clorofórmio:metanol (9,5:0,5); hexano:acetato de etila (8:2); hexano:acetona (8:2); acetato de etila: metanol (1:1); hexano:benzeno:acetona (5:4:1) e acetato de etila (100%). Cada combinação de eluentes foi preparada em recipientes apropriados. Em seguida, placas de cromatografia de alumínio com gel de sílica de 5 x 5 cm foram cortadas em três partes e, com o auxílio de um microcapilar, alíquotas de 2 µL do extrato da linhagem P16 na concentração de 250 µg. µL⁻¹ (em acetato de etila) foram aplicadas nas placas. Estas foram

acondicionadas nas cubas contendo a fase móvel, e após a corrida, as placas foram evaporadas a temperatura ambiente e reveladas com ultravioleta (254 nm) e também com reveladores químicos anisaldeído sulfúrico, permanganato de potássio e ácido fosfomolibdico. A revelação se deu pela aspersão das soluções reveladoras sobre a superfície das placas, seguida do aquecimento a 100°C – 120°C com secador por alguns minutos, até a formação de manchas coloridas na placa cromatográfica. Os valores de R_f foram calculados para cada substância revelada.

Bioautografia: Para este ensaio, alíquotas de uma solução de concentração conhecida (250 $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$, em acetato de etila) do extrato aceto etílico da linhagem P16 de *E. nigrum* foram pontualmente aplicadas em placas de CCD (5 x 5 cm) (três placas), as quais foram a seguir eluídas com clorofórmio:metanol (7:3). Após completa evaporação do solvente, as placas cromatográficas foram transferidas para placas de Petri esterilizadas, sobre as quais foram vertidos 15 mL de meio de cultura semi-sólido apropriado para cada microrganismo indicador, acrescido de 1% (v/v) de inóculo dos microrganismos patogênicos (*C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *X. albilineans*). O preparo deste inóculo foi realizado conforme descrito no item 4.2.1.3.2. Após a solidificação do meio de cultura, as placas de Petri foram armazenadas por 2 horas em geladeira para difusão dos metabólitos das placas cromatográficas para o meio de cultura dos patógenos, e depois a 37°C por 18-24 horas. Os compostos bioativos apareceram como manchas claras sobre um fundo azul escuro após a revelação com aspersão de uma solução 0,05% de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT; Sigma).

4.2.1.6 Comparação dos dados fenotípicos de atividade antimicrobiana com os dados genotípicos de marcadores AFLP e seqüências de ITS

Para verificar se existe uma correlação entre diversidade fisiológica e diversidade genética, os dados de atividade antimicrobiana foram comparados com os dados moleculares de marcadores AFLP e de seqüência da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico, os quais foram previamente obtidos para este mesmo grupo de linhagens, conforme apresentado no capítulo 2 desta tese. Esta análise foi realizada para investigar se estes marcadores moleculares são úteis para identificar genótipos mais promissores quanto à atividade antimicrobiana, e se podem ser utilizados para pré-seleção de linhagens a serem investigadas quimicamente quanto à produção de metabólitos bioativos. Os dados fisiológicos de todos os testes de antagonismo foram combinados em uma matriz de dados binários, considerando presença (1) ou ausência (0)

de zona de inibição contra os diferentes microrganismos patogênicos. A análise fenética dos dados fisiológicos foi realizada com o software NTSYS Version 2.1 (Exeter Software Setauket, NY, USA). A matriz de similaridade foi obtida utilizando o coeficiente de Dice com auxílio do programa SIMQUAL, incluído no software. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA utilizando o algoritmo SAHN (ROHLF, 2000). O dendrograma gerado por esta análise foi comparado com o dendrograma previamente obtido pela análise de marcadores AFLP.

4.2.1.7 Mutagênese insercional mediada por *A. tumefaciens* visando à identificação de genes envolvidos na produção de metabólitos antimicrobianos

Conforme apresentado no capítulo 3 desta tese, uma metodologia de transformação mediada por *A. tumefaciens* foi otimizada para *Epicoccum*, utilizando o gene *hph* de resistência a higromicina B como marcador de seleção e o gene *gfp* como repórter, ambos localizados no vetor de transformação pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003), gentilmente cedido por Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália). No presente capítulo, esta metodologia otimizada foi aplicada para as linhagens P16 e TH2 visando à obtenção de uma biblioteca de transformantes. Estes transformantes foram caracterizados fenotipicamente quanto à perda da atividade antimicrobiana, com o objetivo de identificar genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários bioativos.

4.2.1.7.1 Caracterização fenotípica da biblioteca de transformantes obtidos por transferência gênica mediada por *A. tumefaciens*

Os transformantes das linhagens P16 e TH2 foram caracterizados quanto à perda da atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos patogênicos. Para isso, os transformantes foram crescidos em meio de cultura BDA acrescido de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de higromicina B (Invitrogen, Brasil), em placas de Petri descartáveis de 150 x 15 mm de diâmetro, em um total de 9 transformantes por placa. Estas placas foram incubadas por 3 dias a 28°C e serviram como placas mestras para os experimentos de caracterização. A atividade antimicrobiana dos transformantes foi avaliada pela metodologia modificada de difusão em ágar semi-sólido (SPELHAUG; HARLANDER, 1989), contra os seguintes microrganismos patogênicos: *E. coli*, *M. luteus*, *X. albilineans*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *C. albicans*, para os transformantes da linhagem P16, e *M. luteus*, *X. albilineans*, *S. aureus* e *B. subtilis*, para os transformantes da linhagem TH2.

Após o crescimento dos transformantes nas placas mestras, pequenos fragmentos miceliais foram transferidos, com auxílio de palitos esterilizados, para placas de Petri (150 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura BDA sem higromicina B. As placas foram incubadas por 72 horas a 28°C na ausência de luz. Em seguida, 15 mL de meio de cultura semi-sólido (PDA, Difco, para *C. albicans* e TSB, Difco, para as demais bactérias) inoculado com os patógenos (1% v/v) foram vertidos sobre as placas dos transformantes. Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram armazenadas a 4°C durante 8 horas, para permitir a difusão dos compostos bioativos, e então incubadas a 37°C por 18 horas. Os transformantes foram avaliados quanto à perda da capacidade inibitória dos microrganismos patogênicos (ausência de halo de inibição) em comparação com as respectivas linhagens selvagens. A biblioteca de transformantes foi caracterizada duas vezes, e as linhagens que não produziram halo de inibição foram selecionadas e submetidas a uma segunda etapa de caracterização.

Nesta segunda etapa de caracterização, cada transformante foi avaliado em triplicata, contra os mesmos microrganismos patogênicos descritos anteriormente. Somente os transformantes que não produziram halo de inibição foram selecionados. Estas linhagens foram analisadas por microscopia de fluorescência para confirmar a expressão da proteína verde fluorescente (GFP). Em seguida, estes transformantes foram avaliados quanto à estabilidade, através da passagem em meio de cultura sem higromicina B, por cinco vezes consecutivas. Devido à ausência de conidiação de muitos transformantes, a purificação e a análise da estabilidade foram realizadas por meio da repicagem a partir das extremidades das hifas. Os transformantes purificados desta maneira foram armazenados para as análises posteriores.

4.2.1.7.2 Análise molecular dos transformantes que perderam a capacidade antagonista contra microrganismos patogênicos

4.2.1.7.2.1 Extração de DNA genômico, confirmação da transformação por PCR e análise de *Southern blot*

Os transformantes das linhagens P16 e TH2 foram cultivados em meio de cultura caldo batata acrescido de higromicina B (50 µg.mL⁻¹) durante 10 dias a 28°C. O micélio foi coletado por filtração e o DNA genômico foi extraído de acordo com Raeder e Broda (1985). A confirmação da transformação foi realizada por meio da amplificação de um fragmento de aproximadamente 600pb correspondente ao gene *hph*, utilizando os primers *hph1* (5'–

TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e hph2 (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATAACAAG-3') (MALONEK; MEINHARDT, 2001). As reações foram preparadas em volume final de 25 µL, com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de MgCl₂; Tampão 1x (50mM de KCl e 20mM de Tris-HCl - pH 8,4); 0,05 U.µL⁻¹ de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil) e 0,2 µM de cada iniciador. A amplificação foi realizada em termociclador PTC – 200 (MJ Research) com desnaturação inicial a 94^oC por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 1 min a 94^oC, 1 min a 60^oC e 1 min a 72^oC e extensão final de 7 min a 72^oC.

Para determinar o número de inserções do T-DNA, 15 µg de DNA dos transformantes, bem como 2 µg de DNA do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003), foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, Brasil). O DNA clivado foi separado em gel de agarose 0,8% e os procedimentos padrões descritos por Sambrook e Russel (2001) foram utilizados para transferência do gel para membrana de nylon (0,45 µm, Amersham Hybond N⁺, GE Healthcare). O gene *hph*, utilizado como sonda, foi amplificado a partir do vetor pFAT-gfp com os primers hph1 e hph2 e purificado com UltraClean™ PCR Clean-Up Kit (MOBIO Laboratories). A marcação e hibridização da sonda foram realizadas utilizando o sistema de fosfatase alcalina termoestável (Amersham AlkPhos Direct™ Labeling and Detection Systems, GE Healthcare), sob condições de alta stringência (60°C), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.1.7.2.2 Amplificação, clonagem e seqüenciamento das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA

As regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA no genoma dos transformantes foram identificadas por meio da técnica TAIL-PCR (LIU; WHITTIER, 1995). A amplificação foi realizada utilizando os primers arbitrários AD1, AD2 e AD3 (LIU et al., 1995) em combinação com os primers específicos construídos previamente (capítulo 3) para as seqüências das bordas esquerda e direita do T-DNA do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003). Os primers da borda esquerda foram LB1-1 (5'-GTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG-3'), LB2-2 (5'-CCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTAC-3') e LB3-1 (5'-CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3') e os da borda direita foram RB1 (5'-AAGATGGGCAGTCTTTCAGAAGGG-3'), RB2-2 (5'-ATCGCAAAGTGAAGTCTTGCTGCC-3') e RB3-2 (5'-

CCAAACGTAAAACGGCTTGTCCCGC-3’). A composição das reações de PCR foram as mesmas descritas por Liu et al. (1995) e as reações de amplificação seguiram as condições propostas por Mullins et al. (2001) e foram realizadas em termociclador PTC – 200 (MJ Research). Os produtos das reações terciárias de TAIL-PCR foram purificados do gel de agarose, clonados em plasmídeo pGEM-T Easy (Promega, Brasil) e transformados em células de *E. coli* DH5 α . A amplificação do inserto com os primers universais M13 foi preparada em volume final de 50 μ L, com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de MgCl₂; Tampão 1x (50mM de KCl e 20mM de Tris-HCl - pH 8,4); 0,05 U. μ L⁻¹ de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil) e 0,2 μ M de cada primer. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94^oC por 4 min, com 30 ciclos de amplificação (1 min a 94^oC, 1 min a 60^oC e 2 min a 72^oC, extensão final de 10 min a 72^oC). Os produtos de PCR foram purificados e seqüenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo, Brasil. Posteriormente, a região correspondente ao T-DNA foi retirada e as seqüências flanqueadoras restantes foram analisadas com auxílio da ferramenta BLAST (BlastN, BlastX e TblastX) contra a base de dados do GenBank As seqüências também foram analisadas quanto à presença de ORFs (*open reading frame*) com auxílio da ferramenta ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.2.1.7.3 Análise química dos transformantes que perderam a capacidade antagonista contra microrganismos patogênicos

4.2.1.7.3.1 Obtenção dos extratos orgânicos e bioautografia

A análise química dos transformantes foi realizada por meio de bioautografia, para avaliar a ausência de atividade antimicrobiana do extrato obtido a partir do meio de fermentação destas linhagens, em comparação às linhagens selvagens. Para tanto, as linhagens selvagens e os respectivos transformantes foram cultivados em grande escala em meio de cultura caldo batata, acrescido de 2% de extrato de levedura, durante 60 dias a 28^oC (9 litros para cada transformante). Após o crescimento, o micélio foi coletado por filtração e liofilizado para análises bioquímicas futuras, e o meio de fermentação foi submetido à extração com solventes orgânicos, conforme descrito no item 4.2.1.5. O ensaio de bioautografia foi realizado com o extrato de acetato de etila das linhagens selvagens e transformantes, conforme descrito no item 4.2.1.5. Análises químicas futuras serão realizadas em colaboração com a Prof^ª. Anita Marsaioli (Departamento de Química, Unicamp) visando à caracterização das linhagens selvagens e transformantes de *E. nigrum*.

4.2.2 Resultados e discussões

4.2.2.1 Atividade antifúngica e antibacteriana de isolados endofíticos de *Epicoccum*

A diversidade fisiológica, representada pela capacidade de inibição *in vitro* de diferentes microrganismos patogênicos, foi acessada no presente trabalho para uma coleção de 56 isolados endofíticos de *Epicoccum* provenientes dos tecidos de cana-de-açúcar e também de outros hospedeiros. Em relação à atividade antifúngica, todas as linhagens testadas reduziram significativamente o crescimento radial dos fitopatógenos *C. paradoxa* e *F. verticillioides* (Tabela 4.2). Esta análise mostrou que a atividade antifúngica foi bastante variável entre as linhagens de *Epicoccum* e que *C. paradoxa* foi mais sensível à presença dos endófitos do que *F. verticillioides*, como pode ser notado pela porcentagem de redução do crescimento radial dos patógenos e pela presença e tamanho de zona de inibição entre as colônias fúngicas (Tabela 4.2). Por exemplo, para *C. paradoxa*, 96,42% das linhagens testadas produziram zona de inibição, enquanto que para *F. verticillioides*, 51,78% das linhagens produziram zona de inibição. A inibição foi estável mesmo após 20 dias de cultivo, demonstrando que compostos difusíveis foram liberados no meio de cultura pelos endófitos antagonistas (Figura 4.1).

No ensaio de atividade antibacteriana contra *X. albilineans* e *E. coli*, por meio do método de blocos de ágar (Figura 4.2), foi possível observar que 50% das linhagens produziram halos de inibição contra *X. albilineans*, mas apenas 25% das linhagens produziram halos de inibição contra *E. coli* (Tabela 4.3). Em relação à atividade antibacteriana e contra a levedura *C. albicans*, avaliada por meio da metodologia de difusão em ágar semi-sólido (Figura 4.3), foi possível verificar que 92,6 % das linhagens de *Epicoccum* produziram zonas de inibição contra pelo menos um dos microrganismos testados, e que 7,4% (representados pelas linhagens P81, P13, CE3 e P11) não inibiram nenhum dos patógenos (Tabela 4.3). Destes quatro isolados, dois deles (P81 e P11) também não inibiram os microrganismos testados nos ensaios de pareamento e de blocos de ágar, mostrando que se estas linhagens produzem compostos antimicrobianos, eles não foram detectados pelas metodologias utilizadas. Neste experimento também foi verificada extensa variabilidade da atividade antimicrobiana entre as linhagens endofíticas, e que metabólitos antimicrobianos são produzidos no estágio inicial de crescimento de *Epicoccum*. Neste ensaio, os patógenos mais sensíveis foram *C. albicans*, *X. albilineans* e *M. luteus*, conforme representado pelo tamanho significativamente maior da zona de inibição (Tabela 4.3).

Tabela 4.2 – Ensaio de antagonismo ^(a) de linhagens endofíticas de *Epicoccum* contra os fitopatógenos de cana-de-açúcar *C. paradoxa* e *F. verticillioides* por meio da metodologia de cultura pareada

(continua)

Tratamento	ITS (b)	AFLP (c)	Ensaio de antagonismo contra <i>C. paradoxa</i>			Ensaio de antagonismo contra <i>F. verticillioides</i>		
			Crescimento radial de <i>C. paradoxa</i> (mm)	Redução do crescimento (%)	Zona de inibição (mm)	Crescimento radial de <i>F. verticillioides</i> (mm)	Redução do crescimento (%)	Zona de inibição (mm)
Controle	-	-	75,0 ^a	-	-	75,0 ^a	-	-
CV1	2	NT	40,0 ^b	46,6	3,0 ^{mln}	33,0 ^{fcebd}	56,0	-
1F4	1	1	38,0 ^{cb}	49,3	5,0 ^{ijk}	35,0 ^b	53,3	2,0 ^{fg}
TH21Ep	1	1	35,0 ^{cd}	53,3	5,5 ^{ijh}	33,5 ^{cebd}	55,3	5,0 ^{ba}
CE18	1	1	34,0 ^{ed}	54,6	4,0 ^{mljk}	29,5 ^{feijhg}	60,6	4,0 ^{bcd}
P13	2	NT	34,0 ^{ed}	54,6	3,5 ^{mlnk}	25,0 ^{kml}	66,6	-
CE9	1	1	33,5 ^{edf}	55,3	4,0 ^{mljk}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	2,5 ^{efg}
CBS31883	1	NT	33,0 ^{egdf}	56,0	7,0 ^{fgh}	34,5 ^{cb}	54,0	5,0 ^{ba}
79Ep	1	1	33,0 ^{egdf}	56,0	4,5 ^{iljk}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	4,0 ^{bcd}
CE11	1	1	32,5 ^{hegdf}	56,6	4,5 ^{iljk}	34,5 ^{cb}	54,0	6,0 ^a
C12C	2	NT	32,5 ^{hegdf}	56,6	2,0 ⁿ	31,0 ^{fceibhdg}	58,6	5,0 ^{ba}
CE27	1	1	32,0 ^{hegdfi}	57,3	4,0 ^{mljk}	32,5 ^{fcebdg}	56,6	5,0 ^{ba}
C33Ep	1	1	32,0 ^{hegdfi}	57,3	3,5 ^{mlnk}	29,0 ^{fkijhg}	61,3	3,0 ^{efd}
P11	1	1	32,0 ^{hegdfi}	57,3	-	30,5 ^{fceijhdg}	59,3	-
CE12	1	1	31,5 ^{hegdfi}	58,0	4,5 ^{iljk}	34,5 ^{cb}	54,0	1,5 ^g
CE10	1	1	31,5 ^{hegdfi}	58,0	2,5 ^{mn}	31,0 ^{fceibhdg}	58,6	6,0 ^a
P12	1	1	31,0 ^{hegfi}	58,6	3,0 ^{mln}	31,0 ^{fceibhdg}	58,6	4,5 ^{bc}
CE2	1	1	31,0 ^{hegfi}	58,6	2,0 ⁿ	28,0 ^{kijhl}	62,6	2,0 ^{fg}
P16	1	1	31,0 ^{hegfi}	58,6	4,5 ^{iljk}	34,5 ^{cb}	54,0	4,0 ^{bcd}
P98	1	1	31,0 ^{hegfi}	58,6	3,5 ^{mlnk}	24,0 ^{nml}	68,0	4,0 ^{bcd}
CE29	1	1	31,0 ^{hegfi}	58,6	3,5 ^{mlnk}	30,5 ^{fceijhdg}	59,3	5,0 ^{ba}
CE24	1	1	31,0 ^{hegfi}	58,6	4,0 ^{mljk}	34,5 ^{cb}	54,0	1,5 ^g
CE6	1	1	30,5 ^{hegjfi}	59,3	2,85 ^{mln}	27,5 ^{kijl}	63,3	3,0 ^{efd}
P17	1	1	30,5 ^{hegjfi}	59,3	2,0 ⁿ	30,0 ^{feijhdg}	60,0	2,5 ^{efg}
CE3	1	NT	30,0 ^{hkgjfi}	60,0	4,5 ^{iljk}	27,0 ^{kijl}	64,0	5,0 ^{ba}
63Ep	1	1	30,0 ^{hkgjfi}	60,0	3,0 ^{mln}	27,5 ^{kijl}	63,3	2,0 ^{fg}
P104	2	NT	30,0 ^{hkgjfi}	60,0	3,0 ^{mln}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	-
P81	2	NT	30,0 ^{hkgjfi}	60,0	-	21,0 ^{nm}	72,0	-
CE51	1	1	30,0 ^{hkgjfi}	60,0	8,0 ^{fed}	34,0 ^{cbd}	54,6	4,0 ^{bcd}
C41B	2	2	30,0 ^{hkgjfi}	60,0	2,0 ⁿ	30,0 ^{feijhdg}	60,0	-
TH41Ep	1	NT	29,5 ^{hkgjli}	60,6	3,0 ^{mln}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	2,5 ^{efg}

Tabela 4.2 – Ensaio de antagonismo ^(a) de linhagens endofíticas de *Epicoccum* contra os fitopatógenos de cana-de-açúcar *C. paradoxa* e *F. verticillioides* por meio da metodologia de cultura pareada

(conclusão)

Tratamento	ITS (b)	AFLP (c)	Ensaio de antagonismo contra <i>C. paradoxa</i>			Ensaio de antagonismo contra <i>F. verticillioides</i>		
			Crescimento radial de <i>C. paradoxa</i> (mm)	Redução do crescimento (%)	Zona de inibição (mm)	Crescimento radial de <i>F. verticillioides</i> (mm)	Redução do crescimento (%)	Zona de inibição (mm)
1F15	1	1	29,5 ^{hkgjli}	60,6	4,5 ^{iljk}	35,0 ^b	53,3	2,0 ^{fg}
CE5	1	1	29,0 ^{hkmjli}	61,3	2,5 ^{mn}	27,0 ^{kijl}	64,0	3,0 ^{efd}
CE16	1	1	29,0 ^{hkmjli}	61,3	2,0 ⁿ	25,0 ^{kml}	66,6	2,0 ^{fg}
SP2	2	2	29,0 ^{hkmjli}	61,3	2,5 ^{mn}	29,0 ^{fkijhg}	61,3	-
TH2	2	2	29,0 ^{hkmjli}	61,3	4,0 ^{mljk}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	-
SP1	2	2	28,5 ^{nkmjli}	62,0	5,0 ^{ijk}	28,5 ^{kijhg}	62,0	-
TC41	2	2	28,5 ^{nkmjli}	62,0	7,5 ^{feg}	32,0 ^{facebhdg}	57,3	-
TH31A	2	NT	28,5 ^{nkmjli}	62,0	6,0 ^{igh}	26,5 ^{kjl}	64,6	-
CE39	1	1	28,5 ^{nkmjli}	62,0	4,0 ^{mljk}	27,0 ^{kijl}	64,0	3,5 ^{ecd}
P912	2	NT	27,0 ^{nkmjlo}	64,0	3,0 ^{mln}	28,0 ^{kijhl}	62,6	-
C13B	2	2	26,5 ^{nkmlo}	64,6	6,0 ^{igh}	28,0 ^{kijhl}	62,6	-
TH31B	2	2	26,0 ^{nmpl}	65,3	10,0 ^{bac}	31,0 ^{facebhdg}	58,6	-
C41A	2	2	26,0 ^{nmpl}	65,3	10,0 ^{bac}	29,0 ^{fkijhg}	61,3	-
TC42A	2	2	25,5 ^{nqmpo}	66,0	8,5 ^{fedc}	33,0 ^{facebd}	56,0	-
TC1	2	2	25,0 ^{nqpo}	66,6	10,5 ^{ba}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	-
P82	2	NT	25,0 ^{nqpo}	66,6	11,5 ^a	34,0 ^{cbd}	54,6	-
62Ep	2	2	25,0 ^{nqpo}	66,6	5,5 ^{ijh}	30,5 ^{faceijhdg}	59,3	-
CV2	2	2	25,0 ^{nqpo}	66,6	9,5 ^{bdc}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	-
C13A	2	2	24,5 ^{qpro}	67,3	9,0 ^{bedc}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	-
TC42F	2	2	24,0 ^{qpro}	68,0	7,0 ^{fgh}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	-
P92	2	NT	24,0 ^{qpro}	68,0	7,5 ^{feg}	28,5 ^{kijhg}	62,0	-
C12A	2	2	23,5 ^{qpro}	68,6	4,5 ^{iljk}	24,0 ^{nml}	68,0	-
CV3	2	2	22,5 ^{qpr}	70,0	4,5 ^{iljk}	20,0 ⁿ	73,3	-
C22B	2	2	22,0 ^{qr}	70,6	7,5 ^{feg}	30,0 ^{feijhdg}	60,0	-
P33	2	NT	22,0 ^{qr}	70,6	9,0 ^{bedc}	32,5 ^{facebdg}	56,6	-
TC2	2	NT	21,0 ^r	72,0	8,5 ^{fedc}	28,5 ^{kijhg}	62,0	2,5 ^{efg}

(a) O ensaio de antagonismo foi realizado pela inoculação prévia dos endófitos, os quais foram crescidos por 48 horas antes de inocular os patógenos. (b) Grupos obtidos pela análise filogenética utilizando seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico, conforme discutido no capítulo 2. (c) Grupos gerados pela análise de marcadores AFLP, conforme apresentado no capítulo 2. Os valores representam médias de três repetições, sendo que médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância. A porcentagem de redução do crescimento do patógeno na presença do endófito foi calculada com base no controle. (NT) não testado. (-) ausência de zona de inibição entre as colônias dos endófitos e dos patógenos.

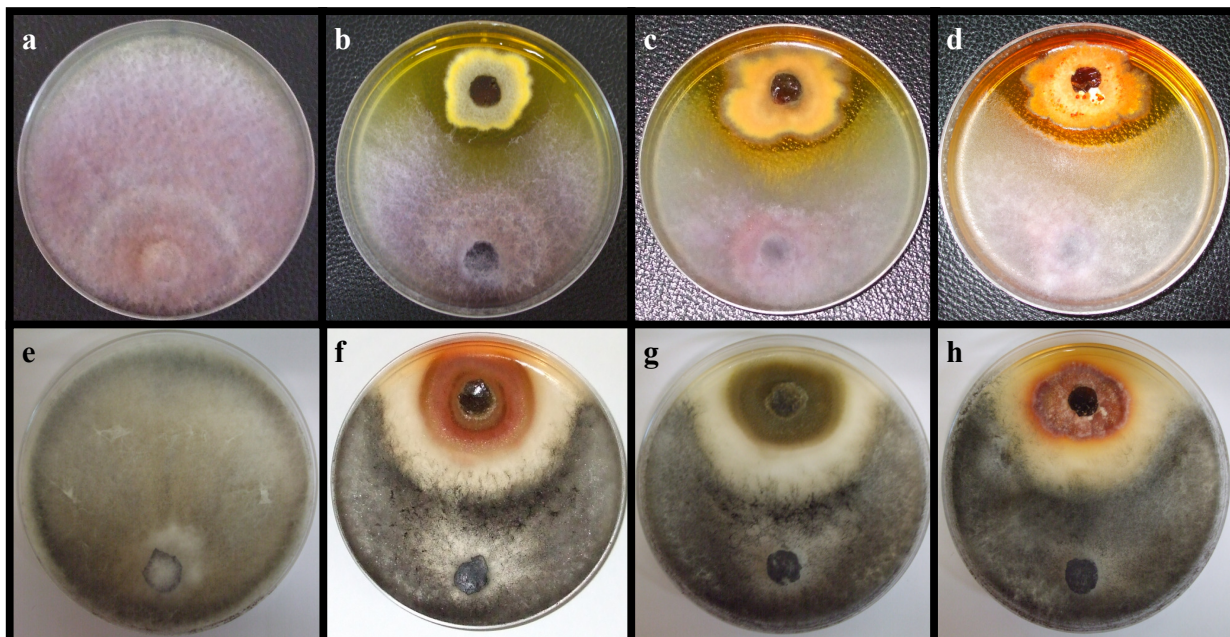


Figura 4.1 - Ensaio de antagonismo *in vitro* de linhagens endofíticas de *Epicoccum* contra os patógenos de cana-de-açúcar *F. verticillioides* e *C. paradoxa* por meio da metodologia da cultura pareada. **(a)** *F. verticillioides*, placa controle. **(b, c, d)** Linhagens CE3, 79Ep e CBS31883 de *E. nigrum*, respectivamente. **(e)** *C. paradoxa*, placa controle. **(f, g, h)** Linhagens TC42A, P33 e P82 de *Epicoccum* sp., respectivamente. É possível visualizar a formação de uma zona de inibição entre as linhagens dos endófitos e dos patógenos. O ensaio foi realizado em meio de cultura BDA e as fotos representam o aspecto das placas após 5 dias de crescimento a 28°C na ausência de luz

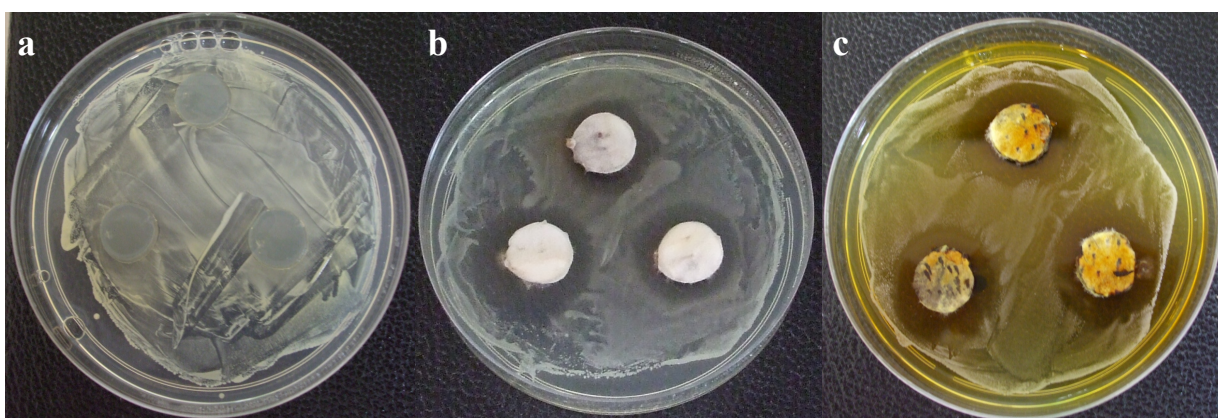


Figura 4.2 – Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas de *Epicoccum* contra a bactéria fitopatogênica de cana-de-açúcar *X. albilineans*, por meio da metodologia de blocos de ágar. A figura representa o aspecto das placas após 18-24 horas de crescimento bacteriano a 37°C. **(a)** *X. albilineans*, placa controle contendo blocos de meio de cultura BDA sem o micélio dos fungos endofíticos. **(b)** Inibição de *X. albilineans* pela linhagem C13A de *Epicoccum* sp. **(c)** Inibição de *X. albilineans* pela linhagem P16 de *E. nigrum*. É possível visualizar uma zona de inibição ao redor dos blocos de ágar contendo o micélio dos fungos endofíticos, resultante da difusão de metabólitos bioativos dos blocos de ágar para o meio de cultura da bactéria fitopatogênica

Tabela 4.3 – Atividade antimicrobiana ^(a) de linhagens endofíticas de *Epicoccum* avaliada pelas metodologias modificadas de blocos de ágar e difusão em ágar semi-sólido

(continua)

Linhagens	Grupo de ITS ^(d)	Grupo de AFLP ^(e)	Metodologia de blocos de ágar ^(b)		Metodologia de difusão em ágar semi-sólido ^(c)					
			Microrganismos testados		Microrganismos testados					
			<i>E. coli</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
P33	2	NT	-	-	23,0 ^a	9,3 ^{ebdhagcf}	9,3 ^{bac}	10,3 ^a	-	-
C41A	2	2	-	20,3 ^{egdfeh}	22,1 ^{ba}	11,1 ^{bac}	11,6 ^a	9,1 ^{bac}	-	-
TC2	2	NT	-	17,6 ^{gih}	21,1 ^{ba}	10,1 ^{bdac}	10,0 ^{ba}	8,3 ^{bdac}	-	-
TC1	2	2	-	19,0 ^{egfh}	19,8 ^{bac}	5,6 ^{njlhkgm}	9,1 ^{bac}	7,0 ^{ebdac}	-	-
CV2	2	2	-	19,0 ^{egfh}	17,6 ^{bdac}	6,6 ^{nejlhdhkgmf}	8,0 ^{bdc}	7,8 ^{ebdac}	-	-
P92	2	NT	-	19,6 ^{egdth}	17,0 ^{ebdac}	9,8 ^{ebdacf}	9,3 ^{bac}	8,3 ^{bdac}	-	-
P82	2	NT	-	-	15,8 ^{ebdfe}	8,3 ^{ejbidhagcf}	7,1 ^{fbedhcg}	4,6 ^{edf}	-	-
C13A	2	2	-	24,6 ^{ba}	15,8 ^{ebdfe}	6,0 ^{nejlhdhkgmf}	7,8 ^{bedc}	5,5 ^{edef}	-	-
C22B	2	2	-	-	15,1 ^{ebdfcg}	7,8 ^{ejbidhkgcf}	11,3 ^a	9,1 ^{bac}	-	-
TC42A	2	2	-	-	13,8 ^{ehdfcg}	5,5 ^{njlhkm}	7,1 ^{fbedhcg}	5,5 ^{edef}	-	-
TC42F	2	2	-	-	13,7 ^{ehdfcg}	5,5 ^{njlhkm}	7,0 ^{fbedhcg}	5,5 ^{edef}	-	-
CV3	2	2	-	-	13,6 ^{ehdfcg}	6,3 ^{nejlhdhkgmf}	7,8 ^{bedc}	7,1 ^{ebdac}	-	-
62Ep	2	2	-	-	13,5 ^{ehdfcg}	5,6 ^{njlhkgm}	7,3 ^{fbedcg}	5,0 ^{edf}	-	-
C13B	2	2	-	-	13,3 ^{ehdfcg}	6,1 ^{nejlhdhkgmf}	6,5 ^{fiedhcg}	5,5 ^{edef}	-	-
TH31A	2	NT	-	-	13,3 ^{ehdfcg}	3,3 ^{nlm}	3,3 ^{iljk}	-	-	-
TH31B	2	2	-	-	13,1 ^{ehdfcg}	9,6 ^{ebdagcf}	7,3 ^{fbedcg}	3,0 ^f	-	-
C12A	2	2	-	-	13,0 ^{ehdfcg}	8,1 ^{ejbidhagcf}	9,0 ^{bac}	-	-	-
TC41	2	2	-	-	12,5 ^{ehdfjg}	8,1 ^{ejbidhagcf}	9,0 ^{bac}	2,8 ^f	-	-
TH2	2	2	-	-	11,3 ^{ehdkfjg}	7,3 ^{ejlhdhkgcf}	7,3 ^{fbedcg}	5,5 ^{edef}	-	-
P912	2	NT	-	19,3 ^{egdth}	10,6 ^{ehldkfjg}	7,0 ^{ejlhdhkgmf}	7,1 ^{fbedhcg}	5,1 ^{edf}	-	-
SP1	2	2	-	-	9,3 ^{hlmkfjg}	-	-	4,5 ^{edf}	-	-
C41B	2	2	-	-	6,8 ^{hlmkij}	3,1 ^{nm}	5,3 ^{filejdthkg}	-	-	-
C12C	2	NT	-	-	6,3 ^{lmkij}	4,6 ^{njlhkm}	5,0 ^{filejdthkg}	3,0 ^f	-	-
P104	2	NT	-	-	5,0 ^{lmk}	3,3 ^{nlm}	3,3 ^{iljk}	-	-	-
CV1	2	NT	-	-	-	7,3 ^{ejlhdhkgcf}	4,1 ^{iljhkg}	6,1 ^{ebdef}	-	-
SP2	2	2	-	-	-	4,8 ^{njlhkm}	7,0 ^{fbedhcg}	-	-	-
P81	2	NT	-	-	-	-	-	-	-	-
P13	2	NT	-	-	-	-	-	-	-	-
CE51	1	1	-	22,0 ^{ebdac}	9,0 ^{hlmkfjg}	8,3 ^{ejbidhagcf}	7,6 ^{fbedc}	10,0 ^{ba}	10,0 ^a	13,7 ^a
CE27	1	1	-	17,0 ^{ih}	9,5 ^{hlmkfjg}	12,0 ^a	6,5 ^{fiedhcg}	6,6 ^{ebdacf}	8,8 ^{ba}	11,2 ^{bdac}
CBS31883	1	NT	29,3 ^a	15,0 ⁱ	8,3 ^{hlmkij}	11,8 ^{ba}	6,8 ^{fbedhcg}	4,7 ^{edf}	5,1 ^{dce}	-
CE12	1	1	-	-	7,9 ^{hlmkij}	10,0 ^{ebdac}	5,3 ^{filejdthkg}	5,8 ^{edcf}	4,5 ^{dfce}	12,3 ^{bac}

Tabela 4.3 – Atividade antimicrobiana ^(a) de linhagens endofíticas de *Epicoccum* avaliada pelas metodologias modificadas de blocos de ágar e difusão em ágar semi-sólido

(conclusão)

Linhagens	Grupo de ITS ^(d)	Grupo de AFLP ^(e)	Metodologia de blocos de ágar ^(b)		Metodologia de difusão em ágar semi-sólido ^(c)					
			Microrganismos testados		Microrganismos testados					
			<i>E. coli</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
CE24	1	1	-	15,0 ¹	7,8 ^{hlmkij}	10,0 ^{ebdac}	5,4 ^{filejdhkg}	5,7 ^{edcf}	4,4 ^{dfce}	12,0 ^{bac}
P16	1	1	17,3 ^{de}	22,6 ^{bdac}	7,3 ^{hlmkij}	9,0 ^{ebdhagef}	4,0 ^{iljkh}	6,1 ^{ebdef}	5,1 ^{dce}	13,5 ^a
C33Ep	1	1	-	17,3 ^{ih}	7,0 ^{hlmkij}	7,8 ^{ejbidhkgcf}	4,6 ^{filejhkg}	7,0 ^{ebdac}	2,5 ^{fe}	8,8 ^{bdc}
P98	1	1	-	17,3 ^{ih}	10,1 ^{ehlmkffjg}	-	-	3,0 ^f	-	-
CE18	1	1	17,0 ^{def}	22,0 ^{ebdac}	6,8 ^{hlmkij}	8,5 ^{ebdhagef}	5,5 ^{filejdhkg}	6,0 ^{edcf}	6,5 ^{bc}	10,1 ^{bdac}
CE6	1	1	16,3 ^{ef}	21,0 ^{egdfc}	6,3 ^{lmkij}	7,3 ^{ejlidhkgcf}	6,3 ^{filejdheg}	5,0 ^{edf}	5,5 ^{dc}	12,0 ^{bac}
1F4	1	1	-	18,3 ^{gfih}	5,8 ^{lmkj}	4,6 ^{njlkm}	2,3 ^l	6,5 ^{ebdacf}	2,6 ^{dfc}	10,1 ^{bdac}
CE11	1	1	16,0 ^{ef}	18,0 ^{gfih}	5,6 ^{lmkj}	9,3 ^{ebdhagef}	6,6 ^{fedhcg}	6,6 ^{ebdacf}	6,0 ^{bc}	10,8 ^{bdac}
CE2	1	1	28,0 ^a	-	5,1 ^{lmk}	7,0 ^{ejlidhkgmf}	6,3 ^{filejdheg}	4,8 ^{edf}	5,8 ^c	10,8 ^{bdac}
TH21	1	1	26,0 ^b	18,3 ^{gfih}	5,1 ^{lmk}	10,0 ^{ebdac}	5,5 ^{filejdhkg}	6,7 ^{ebdacf}	6,6 ^{bc}	11,8 ^{bac}
79Ep	1	1	15,3 ^f	19,3 ^{egdfh}	4,3 ^{lmk}	7,0 ^{ejlidhkgmf}	5,6 ^{filejdhkg}	5,6 ^{edcf}	4,6 ^{dfce}	11,8 ^{bac}
CE16	1	1	-	-	4,3 ^{lmk}	7,0 ^{ejlidhkgmf}	5,0 ^{filejdhkg}	4,3 ^{ef}	5,8 ^c	10,1 ^{bdac}
P12	1	1	-	19,3 ^{egdfh}	4,3 ^{lmk}	4,3 ^{njlkm}	3,1 ^{ljk}	-	2,5 ^{fe}	7,6 ^d
1F15	1	1	-	-	4,0 ^{lm}	7,6 ^{ejldhkgcf}	4,5 ^{filejhkg}	6,1 ^{ebdef}	4,6 ^{dfce}	8,3 ^{dc}
63Ep	1	1	16,0 ^{ef}	19,3 ^{egdfh}	4,0 ^{lm}	5,8 ^{njlhkgmf}	4,6 ^{filejhkg}	7,0 ^{ebdac}	6,3 ^{bc}	12,8 ^{ba}
TH41Ep	1	NT	25,0 ^b	-	3,6 ^{lm}	-	-	-	-	-
CE5	1	1	-	-	3,1 ^m	3,8 ^{nlkm}	2,8 ^{lk}	4,6 ^{edf}	1,8 ^f	7,1 ^d
CE9	1	1	19,3 ^c	23,3 ^{bac}	-	2,8 ⁿ	4,1 ^{iljhkg}	4,0 ^{ef}	2,5 ^{fe}	-
P17	1	1	17,0 ^{def}	20,0 ^{egdfch}	-	6,0 ^{nejlhkgmf}	5,0 ^{filejdhkg}	-	4,3 ^{dfce}	-
CE39	1	1	-	17,0 ^{ih}	-	2,8 ⁿ	3,1 ^{ljk}	4,0 ^{ef}	4,3 ^{dfce}	7,0 ^d
CE3	1	NT	-	17,6 ^{gh}	-	-	-	-	-	-
P11	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
CE29	1	1	18,6 ^{dc}	25,5 ^a	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CE10	1	1	16,0 ^{ef}	21,3 ^{ebdfc}	NT	NT	NT	NT	NT	NT

(a) A atividade antimicrobiana foi avaliada pela medida do tamanho da zona de inibição do crescimento dos patógenos. (b) Os blocos de ágar foram provenientes de colônias dos endófitos crescidas durante 15 dias em meio BDA. (c) As colônias dos endófitos cresceram 3 dias antes de serem cobertas com meio semi-sólido contendo os patógenos. (d) Grupos obtidos pela análise filogenética utilizando seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico, conforme discutido no capítulo 2. (e) Grupos gerados pela análise de marcadores AFLP, conforme apresentado no capítulo 2. Os valores representam médias de três repetições, sendo que médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância. (NT) não testado. (-) ausência de zona de inibição contra os microrganismos patogênicos.

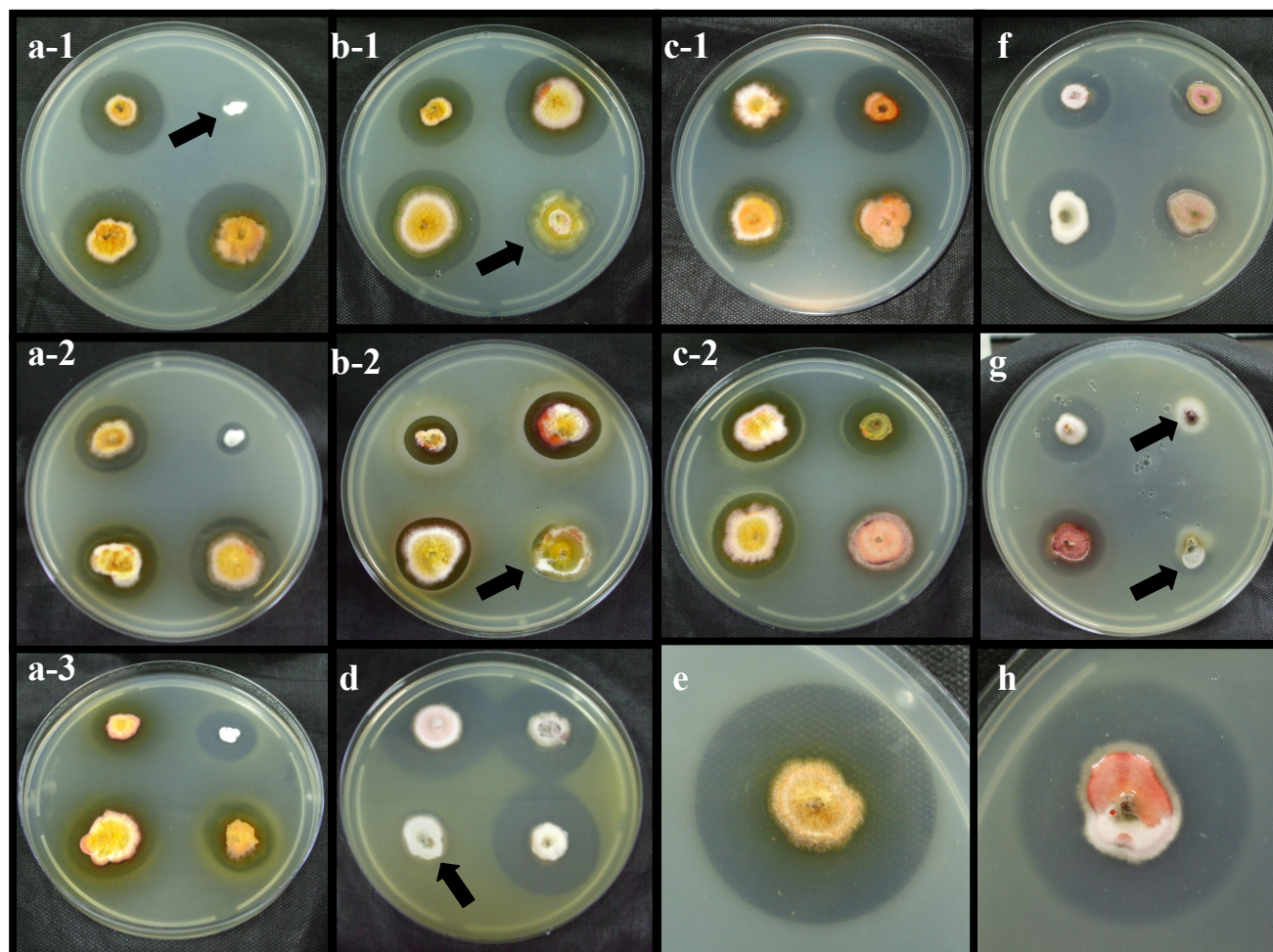


Figura 4.3 – Atividade antimicrobiana de isolados endofíticos de *Epicoccum* avaliada por difusão em ágar semi-sólido. **(a-1, a-2, a-3)** Representa quatro linhagens de *E. nigrum* avaliadas contra *C. albicans*, *B. subtilis* e *M. luteus*, respectivamente; a seta indica ausência de inibição de *C. albicans* pela linhagem P98. **(b-1, b-2)** Representa outras quatro linhagens de *E. nigrum* avaliadas contra *C. albicans* e *B. subtilis*, respectivamente; as setas indicam ausência de inibição pela linhagem TH41Ep. **(c-1, c-2)** Representa outras quatro linhagens de *E. nigrum* avaliadas contra *C. albicans* e *B. subtilis*, respectivamente; é possível notar maior sensibilidade de *C. albicans*. **(d)** Atividade antimicrobiana de quatro linhagens de *Epicoccum* sp. contra *M. luteus*; a seta indica ausência de inibição pela linhagem P13. **(e)** Detalhe da zona de inibição da linhagem CE51 de *E. nigrum* contra *C. albicans*. **(f, g)** Representa inibição de *S. aureus* por 8 linhagens de *Epicoccum* sp.; as setas indicam ausência de inibição das linhagens SP1 e P13. **(h)** Detalhe da zona de inibição contra *S. aureus* produzida pela linhagem C41A

Embora seja difícil comparar os métodos de blocos de ágar e difusão em ágar semi-sólido, devido ao período de crescimento diferente ao qual os endófitos foram submetidos em cada teste (15 dias e 3 dias, respectivamente), alguns aspectos puderam ser notados. Por exemplo, a atividade contra *E. coli* foi verificada para 25% das linhagens no teste de blocos de ágar, enquanto que 40,7% das linhagens mostraram atividade contra esta bactéria no teste de ágar semi-sólido. O mesmo comportamento foi verificado para *X. albilineans*, a qual foi inibida por 50% das linhagens no teste de blocos de ágar, e por 87,04% das linhagens no teste de ágar semi-sólido (Tabela 4.3). Em alguns casos, como para as linhagens P98, CE3 e TH41, foi verificada atividade antimicrobiana no teste de blocos de ágar, mas não no teste de ágar semi-sólido, evidenciando que estas linhagens necessitam de um tempo maior de cultivo para detecção da atividade antimicrobiana. O contrário foi observado para linhagens como 1F15, CE51 e CE2, as quais mostraram atividade antibacteriana no teste de ágar semi-sólido, mas não no teste de blocos de ágar, mostrando que a atividade destas linhagens diminui com o tempo de cultivo. Estes resultados sugerem que dependendo do método utilizado para *screening* de fungos, a atividade biológica pode ser subestimada, devido à variabilidade fisiológica dos isolados. De maneira geral, os testes de atividade antimicrobiana demonstraram que 30,36% das linhagens avaliadas inibiram todos os microrganismos patogênicos testados, independentemente do método utilizado para determinação da atividade biológica. A elevada heterogeneidade dos perfis de atividade antimicrobiana sugere a produção de diferentes substâncias inibidoras por estas linhagens, conforme representado pelo espectro variado de atividade inibitória (Tabelas 4.2 e 4.3).

A atividade antagonista *in vitro* de *E. nigrum* já foi demonstrada contra diferentes fungos fitopatogênicos (CHAND; LOGAN, 1984; WEBBER; HEDGER, 1986; MELGAREJO; CARRILLO; SAGASTA, 1985; ZHOU; REELEDER; SPARACE, 1991; CAMPANILE; RUSCELLI; LUISI, 2007), bem como para os oomicetos *Pythium* ssp. e *Phytophthora* ssp. (BROWN; FINLAY; WARD, 1987). De fato, a capacidade de biocontrole de diferentes patógenos é amplamente reconhecida para *E. nigrum* (ZHOU; REELEDER, 1989; PIECKENSTAIN et al., 2001; HASHEM; ALI, 2004) e sua utilização é efetiva para o controle de *Monilinia* spp. em pêssego e nectarina (LARENA et al., 2005; MARI et al., 2007; DE CAL et al., 2009). *E. nigrum* é conhecido por produzir vários compostos antifúngicos dependendo do meio de crescimento (BROWN; FINLAY; WARD, 1987). Alguns destes compostos têm sido caracterizados: epicorazinas A e B (BAUTE et al., 1978), epirodinas A e B (IKAWA et al., 1978)

e flavipina (BAMFORD; NORRIS; WARD, 1961). Nos casos em que a atividade antifúngica foi avaliada quimicamente, o composto flavipina foi responsável pela inibição de *M. laxa* (MADRIGAL; TADEO; MELGAREJO, 1991). Para os oomicetos *Pythium* ssp. e *Phytophthora* ssp., além da flavipina, os compostos epicorazinas A e B e outras substâncias não identificadas foram responsáveis pela inibição (BROWN; FINLAY; WARD, 1987).

Em relação à atividade antibacteriana, as epicorazinas A e B mostraram atividade contra *S. aureus* (BAUTE et al., 1978), enquanto que as epirodinas A e B inibiram *B. megaterium* (BURGE et al., 1976). A atividade antibacteriana da flavipina foi considerada fraca (BAMFORD; NORRIS; WARD, 1961). Mais recentemente, Kemami-Wangun e Hertweck (2007) isolaram novos metabólitos (epipiridona e epicocarinas A e B) de um isolado de *Epicoccum* sp. obtido do corpo de frutificação de *Pholiota squarrosa*, pertencentes aos compostos híbridos entre policetídeos e aminoácidos. Epipiridona e epicocarina B mostraram atividade moderada contra bactérias gram-positivas, enquanto que epicocarina A mostrou potente atividade antibacteriana seletiva a *Mycobacterium vaccae*. Compostos novos do grupo das epipolítiodioxopiperazinas, denominados epicocinas A-D, também foram obtidos de um isolado de *E. nigrum* colonizando o fungo *Cordyceps sinensis* e mostraram atividade seletiva contra *B. subtilis* (ZHANG et al., 2007).

O alto grau de variação de linhagem para linhagem observado neste trabalho demonstra a importância da avaliação de diferentes linhagens em programas de *screening* de produtos naturais bioativos, de modo a garantir o máximo de informação possível sobre os isolados de uma determinada espécie. A variação observada no presente trabalho também foi relatada por Peláez et al. (1998) para diferentes espécies de fungos endofíticos isolados de plantas da região do Mediterrâneo. Embora o perfil de metabólitos secundários seja homogêneo e efetivamente utilizado em estudos taxonômicos de espécies como *Penicillium*, *Aspergillus* e outros fungos (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008), também existem relatos sobre a existência de diferenças significativas na produção de metabólitos entre isolados de uma mesma espécie (MÖLLER; WEBER; DREYFUSS, 1996; SEYMOUR et al., 2004).

4.2.2.2 Atividade biológica de extratos orgânicos de linhagens endofíticas de *Epicoccum*

Os resultados da análise antimicrobiana do extrato de acetato de etila estão sumarizados na Tabela 4.4. Esta análise revelou grande variação no rendimento do extrato (mg) entre as linhagens, mesmo em condições idênticas de crescimento e extração. O extrato (2 mg por disco)

de todas as linhagens testadas produziu halos de inibição contra os microrganismos patogênicos avaliados. Os patógenos mais sensíveis foram *C. albicans* e *X. albilineans*, com zonas de inibição iguais ou significativamente superiores às produzidas pelos antibióticos higromicina e espectinomomicina, respectivamente (1 mg por disco) (Figura 4.4). Um aspecto importante dessa análise foi que alguns isolados que não produziram atividade antimicrobiana em nenhum dos testes anteriores (por exemplo, os isolados P81 e P13) ou não produziram atividade contra algum microrganismo específico, apresentaram atividade biológica no extrato orgânico (Tabela 4.4). Estes resultados sugerem que os metabólitos destas linhagens podem apresentar diferenças quanto à solubilidade e capacidade de difusão em ágar, ou que elas necessitam de um tempo maior, por exemplo, após atingir a fase estacionária de crescimento, para produção de metabólitos em níveis detectáveis. Resultados semelhantes foram relatados por Janeš et al. (2007) quando avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de diferentes fungos endofíticos pelas técnicas de difusão em ágar e microdiluição, verificando atividade com esta última, mas não nos testes de difusão em ágar.

O extrato de acetato de etila também foi testado contra fungos fitopatogênicos e oomicetos (Figura 4.5). Esta análise demonstrou maior sensibilidade de *C. falcatum* e *Phytophthora* sp. Concentrações de 0,1 a 2,0 mg.mL⁻¹ reduziram significativamente o crescimento dos patógenos, como demonstrado pela redução de 100% do crescimento de *Phytophthora* sp. A alta concentração de extrato necessária para inibir o crescimento dos patógenos foi bem diferente dos resultados obtidos por Brown, Finlay e Ward (1987) para os oomicetos *Phytophthora* ssp. e *Pythium* ssp. Estes autores avaliaram frações purificadas de flavipina e epicorazinas e relataram redução de 50% do crescimento dos patógenos com concentrações variando de 27 a 195 µg.mL⁻¹. Estes autores também verificaram que a produção destes compostos foi máxima até 12 dias de cultivo, diminuindo após este período. Embora a natureza dos compostos antifúngicos não tenha sido determinada, é possível que o tempo de 45 dias utilizado para obtenção dos extratos tenha sido excessivo, embora atividade antimicrobiana tenha sido detectada em todos os extratos avaliados. A análise de bioautografia foi realizada para o extrato de acetato de etila da linhagem P16 de *E. nigrum* (Figura 4.6). Esta análise preliminar mostrou que este extrato contém atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados anteriormente. Análises químicas estão sendo realizadas para esta linhagem, a fim de caracterizar os compostos bioativos e compará-los aos já descritos na literatura para esta espécie.

Tabela 4.4 - Rendimento e atividade antimicrobiana do extrato de acetato de etila ^(a) de linhagens endofíticas de *Epicoccum* (continua)

Linh.	ITS (b)	AFLP (c)	pH (d)	Rend. (mg)	Diâmetro do halo de inibição ^(e) contra microrganismos patogênicos (mm)											
					<i>C. albicans</i>		<i>X. albilineans</i>		<i>M. luteus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>	
					NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A
CV3	2	2	10,0	136,3	26,0 ^a	26,5 ^a	17,5 ^{gijh}	18,0 ^{gfe}	13,5 ^{gfh}	12,0 ^{ih}	11,5 ^{jki}	12,0 ^{jghfi}	11,0 ^{jih}	11,2 ^{ighj}	9,0 ^{dc}	9,0 ^{dce}
P13	2	NT	7,0	155,8	25,0 ^{ba}	25,0 ^{ba}	19,0 ^{gdhce}	18,0 ^{gfe}	15,0 ^{gef}	14,0 ^{ifneg}	14,0 ^{hfge}	12,5 ^{ghfi}	11,0 ^{jih}	11,5 ^{ighf}	9,0 ^{dc}	8,5 ^{de}
C41A	2	2	11,0	95,4	25,0 ^{ba}	24,5 ^{bac}	16,0 ^{likj}	16,0 ^{gijh}	11,5 ^h	14,0 ^{ifneg}	13,0 ^{hjgi}	13,0 ^{ghfe}	10,0 ^{jk}	9,6 ^{klj}	9,0 ^{dc}	9,0 ^{dce}
C12C	2	NT	7,0	258,1	25,0 ^{ba}	26,5 ^a	20,5 ^{dce}	21,0 ^{dc}	20,0 ^b	18,0 ^{cbd}	17,5 ^c	16,5 ^c	14,0 ^{cd}	14,0 ^d	10,0 ^{dc}	9,5 ^{dce}
CE51	1	1	9,0	148,0	25,0 ^{ba}	25,0 ^{ba}	16,0 ^{likj}	16,5 ^{gih}	15,5 ^{gefd}	15,5 ^{fed}	12,5 ^{hji}	13,5 ^{gfe}	10,0 ^{jk}	10,5 ^{kilj}	11,0 ^c	11,0 ^c
P82	2	NT	7,0	237,2	25,0 ^{ba}	26,5 ^a	21,5 ^{dc}	21,5 ^c	18,5 ^{cbd}	18,0 ^{cbd}	16,0 ^{dce}	15,0 ^{dce}	12,0 ^{ghf}	11,0 ^{kighj}	10,8 ^c	10,5 ^{dc}
TH2	2	2	7,0	179,0	25,0 ^{ba}	26,5 ^a	20,5 ^{dce}	20,0 ^{dce}	15,0 ^{gef}	13,5 ^{ifneg}	15,0 ^{dfge}	15,0 ^{dce}	14,5 ^d	13,0 ^{edf}	8,5 ^{dc}	8,5 ^{de}
C12A	2	2	6,0	192,0	24,5 ^{bac}	26,0 ^a	19,5 ^{gdhce}	20,0 ^{dce}	19,3 ^{cb}	19,0 ^b	15,0 ^{dfge}	14,0 ^{dfe}	12,0 ^{ghf}	11,5 ^{ighf}	10,0 ^{dc}	10,0 ^{dce}
P33	2	NT	7,0	200,2	24,0 ^{bdac}	23,5 ^{bdce}	20,0 ^{dfce}	20,0 ^{dce}	15,5 ^{gefd}	15,0 ^{feg}	14,0 ^{hfge}	13,5 ^{gfe}	11,0 ^{jih}	9,6 ^{klj}	8,5 ^{dc}	9,0 ^{dce}
P81	2	NT	9,0	70,0	23,5 ^{ebdac}	25,5 ^{ba}	17,0 ^{gikhj}	15,5 ^{kjih}	15,0 ^{gef}	15,0 ^{feg}	13,5 ^{hfgi}	12,0 ^{jghfi}	12,5 ^{gf}	12,5 ^{egdf}	9,0 ^{dc}	9,0 ^{dce}
TC41	2	2	9,0	213,9	23,0 ^{ebdacf}	26,5 ^a	22,0 ^c	20,5 ^{dc}	15,0 ^{gef}	13,5 ^{ifneg}	16,5 ^{dc}	15,0 ^{dce}	14,5 ^d	13,5 ^{cd}	8,5 ^{dc}	9,0 ^{dce}
CE12	1	1	7,0	196,7	23,0 ^{ebdacf}	22,0 ^{edf}	15,5 ^{lkmj}	16,0 ^{gijh}	16,5 ^{cefd}	15,5 ^{fed}	12,5 ^{hji}	13,0 ^{ghfe}	11,0 ^{jih}	11,0 ^{kighj}	11,0 ^c	10,5 ^{dc}
CE11	1	1	7,0	149,5	22,5 ^{ebdgcf}	25,0 ^{ba}	15,0 ^{lkmj}	16,5 ^{gih}	13,5 ^{gfh}	15,5 ^{fed}	12,5 ^{hji}	12,0 ^{jghfi}	12,0 ^{ghf}	14,0 ^d	10,5 ^{dc}	10,0 ^{dce}
TH21	1	1	11,0	132,4	22,5 ^{ebdgcf}	22,0 ^{edf}	14,0 ^{lm}	14,0 ^{kj}	18,0 ^{cebd}	16,0 ^{ced}	11,5 ^{jki}	12,0 ^{jghfi}	8,0 ^l	9,5 ^{kl}	9,0 ^{dc}	8,0 ^e
1F4	1	1	7,0	173,4	21,5 ^{ehdgcf}	22,5 ^{edc}	13,0 ^m	13,5 ^k	15,0 ^{gef}	15,0 ^{feg}	11,5 ^{jki}	11,0 ^{jhi}	11,0 ^{jih}	11,0 ^{kighj}	8,0 ^d	8,0 ^e
C22B	2	2	11,0	109,2	21,0 ^{ehdgcf}	21,5 ^{edf}	18,5 ^{gifhe}	20,0 ^{dce}	13,5 ^{gfh}	14,0 ^{ifneg}	13,0 ^{hjgi}	12,5 ^{ghfi}	11,5 ^{gih}	10,5 ^{kilj}	9,0 ^{dc}	8,0 ^e
CE2	1	1	9,0	125,7	21,0 ^{ehdgcf}	20,5 ^{ef}	14,0 ^{lm}	14,0 ^{kj}	14,5 ^{gfh}	14,5 ^{fhcg}	12,0 ^{bjki}	12,0 ^{jghfi}	12,5 ^{gf}	11,0 ^{kighj}	9,0 ^{dc}	9,5 ^{dce}
79Ep	1	1	7,0	194,0	21,0 ^{ehdgcf}	22,5 ^{edc}	16,5 ^{likhj}	14,5 ^{kji}	19,0 ^{cb}	18,5 ^{cb}	13,0 ^{bjgi}	13,0 ^{ghfe}	12,5 ^{gf}	13,0 ^{edf}	10,0 ^{dc}	9,0 ^{dce}
CV1	2	NT	8,0	130,9	20,5 ^{ehgf}	20,0 ^{gf}	15,5 ^{lkmj}	14,0 ^{kj}	13,0 ^{gh}	11,5 ⁱ	10,0 ^k	10,0 ^j	10,0 ^{jk}	10,0 ^{kij}	8,0 ^d	9,5 ^{dce}
63Ep	1	1	9,0	148,3	20,0 ^{hgf}	20,0 ^{gf}	14,5 ^{lkm}	14,5 ^{kji}	13,0 ^{gh}	13,0 ^{ifhg}	11,0 ^{jk}	10,5 ^{ji}	9,0 ^{lk}	9,3 ^l	8,0 ^d	8,0 ^e
P16	1	1	9,0	224,4	20,0 ^{hgf}	20,0 ^{gf}	15,5 ^{lkmj}	15,5 ^{kjih}	14,0 ^{gfh}	13,6 ^{ifhg}	12,5 ^{hji}	11,5 ^{jghi}	10,5 ^{ji}	9,0 ^l	8,5 ^{dc}	9,0 ^{dce}
CE18	1	1	7,0	164,6	20,0 ^{hgf}	21,0 ^{ef}	16,0 ^{likj}	15,0 ^{kjih}	15,5 ^{gefd}	15,0 ^{feg}	11,0 ^{jk}	10,0 ^j	13,0 ^{ef}	12,0 ^{ghf}	10,0 ^{dc}	9,5 ^{dce}

Tabela 4.4 - Rendimento e atividade antimicrobiana do extrato de acetato de etila ^(a) de linhagens endofíticas de *Epicoccum* (conclusão)

Linh.	ITS (b)	AFLP (c)	pH (d)	Rend. (mg)	Diâmetro do halo de inibição ^(e) contra microrganismos patogênicos (mm)											
					<i>C. albicans</i>		<i>X. albilineans</i>		<i>M. luteus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>	
					NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A
P98	1	1	10,0	149,7	19,5 ^{hg}	18,0 ^{hg}	20,0 ^{dfce}	20,0 ^{dce}	18,5 ^{cbd}	19,0 ^b	15,5 ^{dfce}	16,0 ^{dc}	11,2 ^{gjh}	11,0 ^{klghj}	9,5 ^{dc}	10,0 ^{dce}
CE3	1	NT	7,0	76,6	18,5 ^{hi}	20,0 ^{gf}	13,0 ^m	13,5 ^k	13,5 ^{gfh}	12,5 ^{ihg}	11,5 ^{iki}	12,0 ^{ighfi}	10,5 ^{ji}	11,5 ^{ighf}	9,0 ^{dc}	8,5 ^{de}
CBS31883	1	NT	9,0	133,3	16,0 ⁱ	16,0 ^h	17,5 ^{gihj}	17,0 ^{gfh}	14,5 ^{gfh}	13,0 ^{ihg}	11,0 ^{jk}	10,0 ^j	11,5 ^{gih}	10,0 ^{klij}	8,0 ^d	8,5 ^{de}
Higromic.	-	-	-	-	26,0 ^a	26,0 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spectinom.	-	-	-	-	-	-	19,0 ^{gdhfe}	19,0 ^{dfe}	31,6 ^a	31,6 ^a	20,0 ^b	20,0 ^b	22,0 ^c	22,0 ^c	21,6 ^b	21,6 ^b
Rifampic.	-	-	-	-	-	-	29,0 ^b	29,0 ^b	29,3 ^a	29,3 ^a	30,0 ^a	30,0 ^a	30,6 ^a	30,6 ^a	25,0 ^a	25,0 ^a
Estreptom.	-	-	-	-	-	-	34,0 ^a	34,0 ^a	30,0 ^a	30,0 ^a	21,3 ^b	21,3 ^b	25,0 ^b	25,0 ^b	20,0 ^b	20,0 ^b

(a) O extrato de acetato de etila foi obtido do meio de fermentação das linhagens após crescimento durante 45 dias em 200 mL de meio de cultura caldo batata acrescido de 2% de extrato de levedura. **(b)** Grupos obtidos pela análise filogenética utilizando seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico, conforme descrito no capítulo 2 desta tese. **(c)** Grupos e subgrupos formados pela análise de marcadores AFLP, conforme descrito no capítulo 2 desta tese. **(d)** O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 6,8; o valor de pH representado na tabela corresponde ao pH final após 45 dias de crescimento a 28°C. **(e)** A atividade antimicrobiana foi avaliada em discos de papel filtro embebidos em 20 µL do extrato de acetato de etila, a uma concentração estoque de 100 mg.mL⁻¹ em DMSO. **Rend.:** Rendimento, em mg, do extrato de acetato de etila. **(NA)** Extrato de acetato de etila não aquecido. **(A)** Extrato de acetato de etila aquecido a 100°C durante 1 hora. Para fins de comparação, foram utilizados 20 µL dos antibióticos: higromicina para *C. albicans* e espectinomicina, rifampicina e estreptomicina para as demais bactérias, a uma concentração estoque de 50 mg.mL⁻¹. Estes antibióticos não foram tratados com aquecimento, e os valores dos halos de inibição foram incluídos nas análises estatísticas tanto dos extratos não aquecidos, quanto dos extratos tratados com aquecimento. Os valores representam as médias de três repetições; médias seguidas de letras iguais, em cada coluna, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância. **(NT)** Não testado.

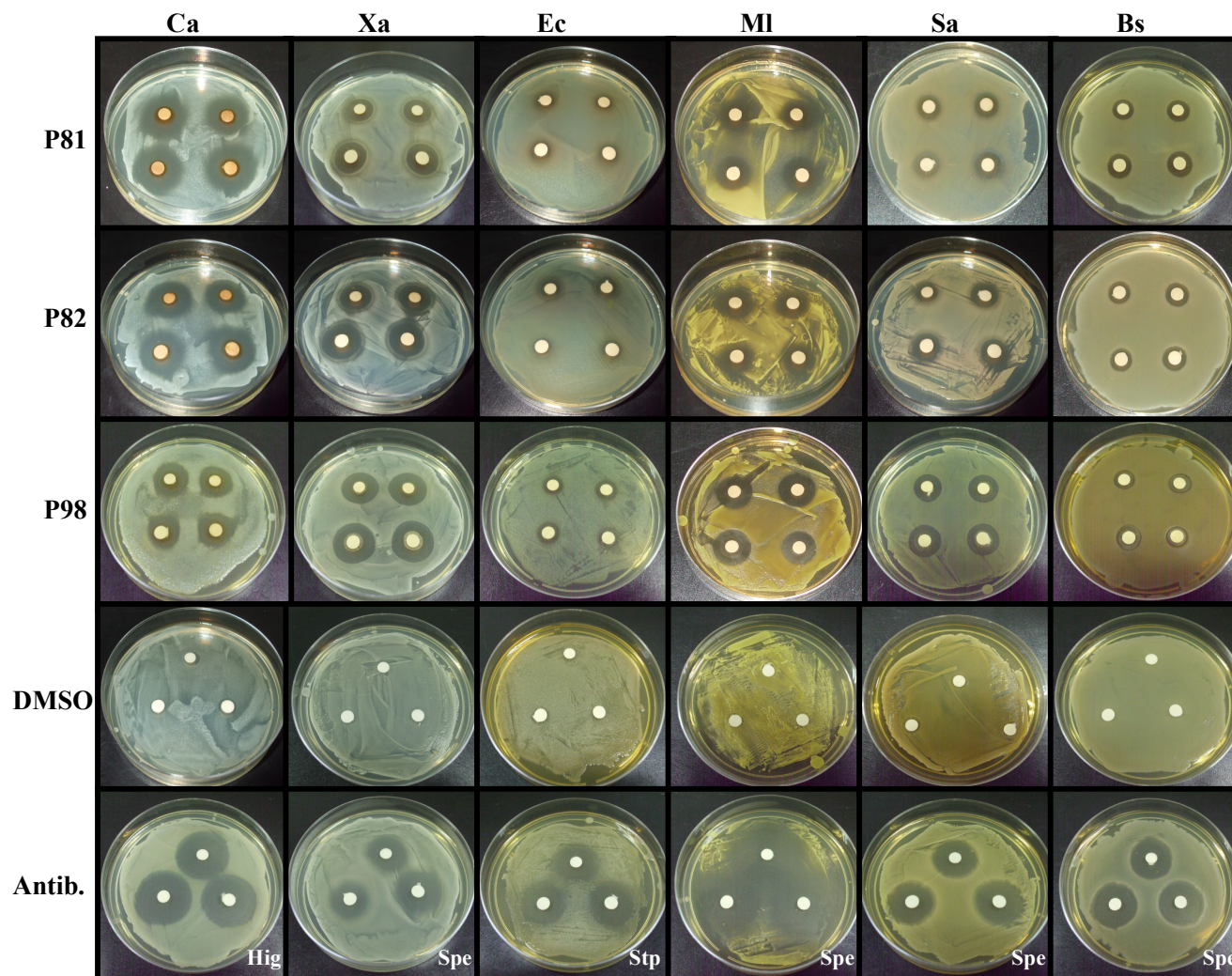


Figura 4.4 – Atividade antimicrobiana do extrato de acetato de etila de linhagens endofíticas de *Epicoccum*. O extrato foi ajustado para uma concentração de $100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em DMSO e alíquotas de $20\ \mu\text{L}$ foram aplicadas em discos de papel filtro. O controle consistiu na aplicação de DMSO. Alíquotas dos antibióticos higromicina B (Hig), espectinomicina (Spe) e estreptomicina (Stp) na concentração de $50\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram utilizadas como controle positivo. O extrato das linhagens P81, P82 e P98 foi testado contra *C. albicans* (Ca), *X. albilineans* (Xá), *E. coli* (Ec), *M. luteus* (MI), *S. aureus* (Sa) e *B. subtilis* (Bs)

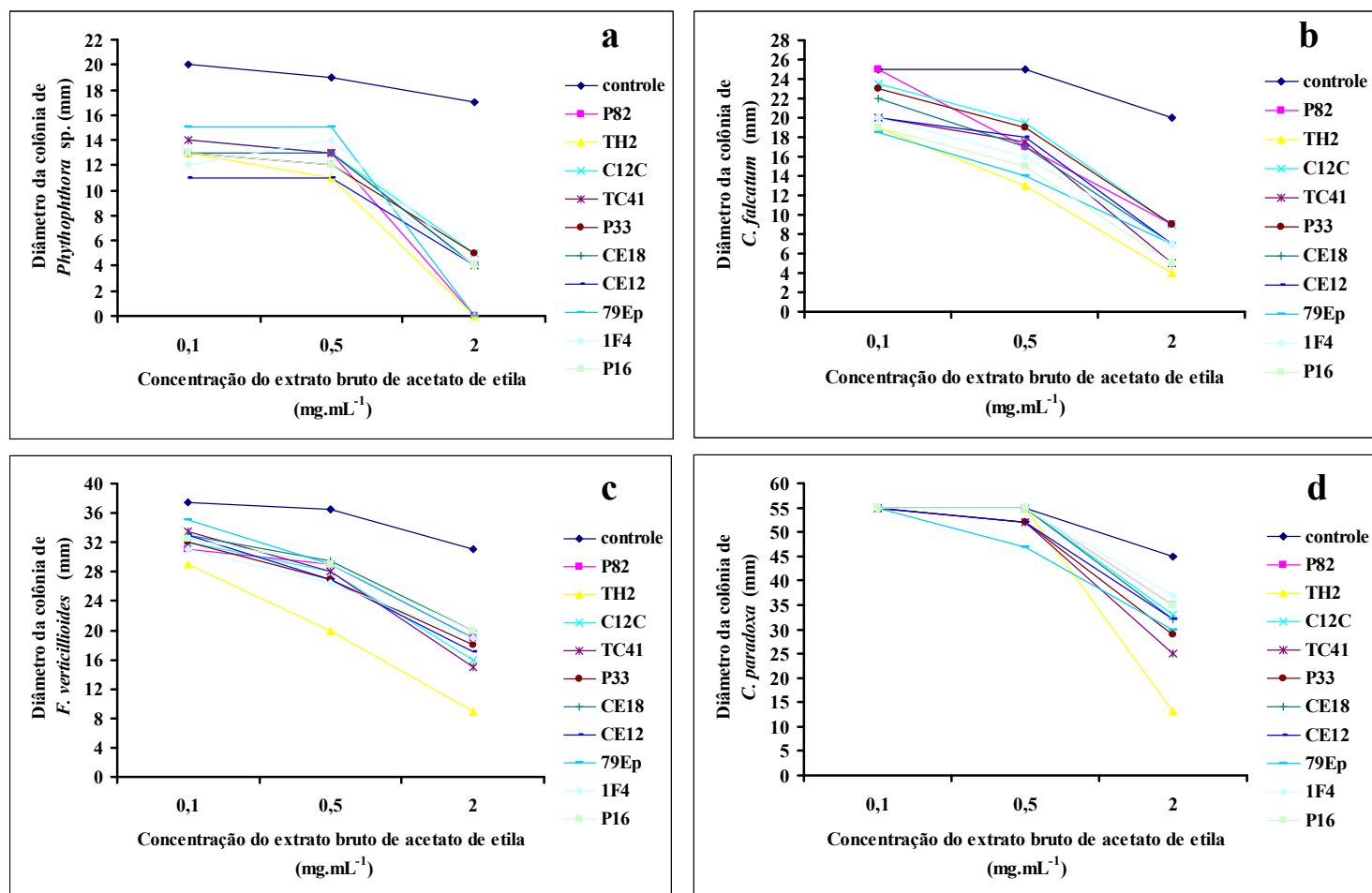


Figura 4.5 – Atividade antifúngica do extrato de acetato de etila (100 mg.mL^{-1} em DMSO) de 10 linhagens endofíticas de *Epicoccum*. A atividade foi avaliada pela comparação do diâmetro da colônia dos patógenos na presença de concentrações crescentes do extrato, em comparação ao controle (DMSO). Os valores representam a média de três repetições para cada concentração testada. Para *Phythophthora* sp. (a), todos os valores dos diâmetros correspondentes às concentrações de 0,1, 0,5 e 2,0 mg.mL^{-1} dos extratos das 10 linhagens são significativamente diferentes do controle (teste de Tukey a 5% de significância). Para *C. falcatum* (b) e *F. verticilloides* (c), todos os valores dos diâmetros obtidos com os 10 extratos são significativamente diferentes do controle para as concentrações de 0,5 e 2,0 mg.mL^{-1} . Para *C. paradoxa* (d) todos os valores de diâmetro obtidos com os 10 extratos são significativamente diferentes do controle para a concentração de 2,0 mg.mL^{-1} .

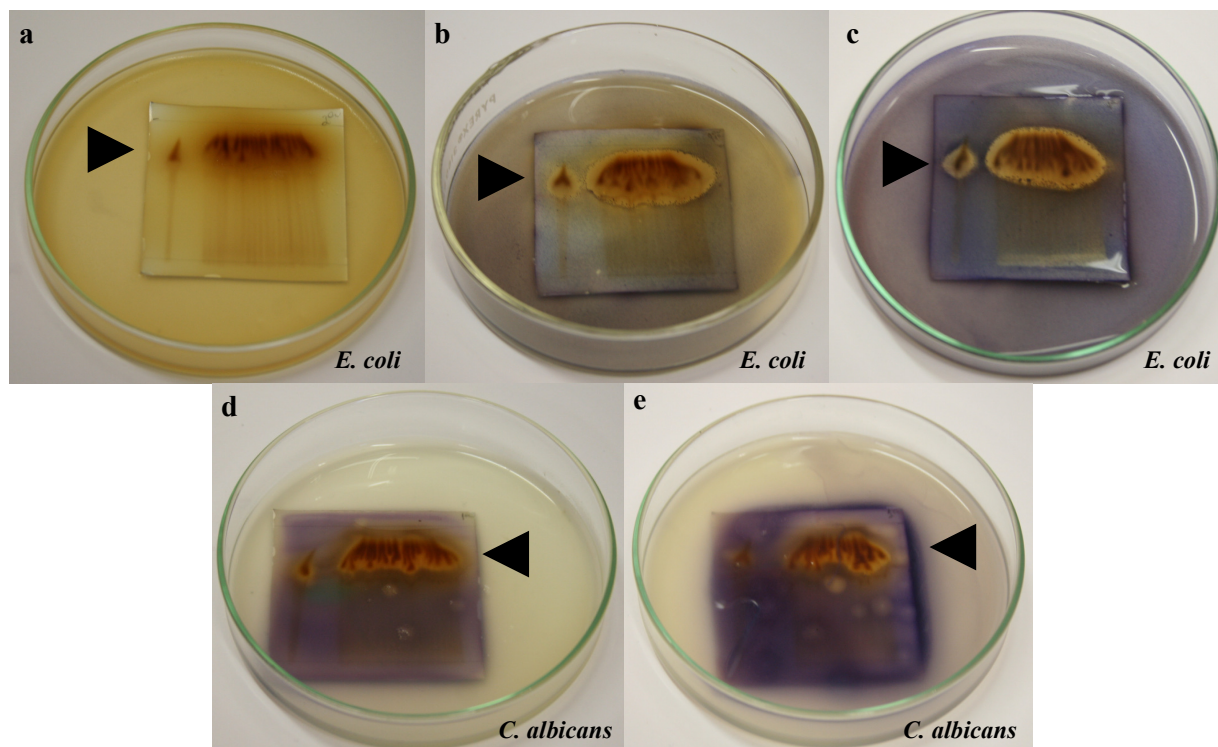


Figura 4.6 – Ensaio preliminar de bioautografia do extrato de acetato de etila obtido do meio de fermentação da linhagem P16 de *E. nigrum*. Aliquotas do extrato ($250 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) foram pontualmente aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada as quais foram eluídas em clorofórmio:metanol (7:3). Culturas dos microrganismos patogênicos foram vertidas sobre as placas e após crescimento a 37°C por 24 horas, as placas foram reveladas com MTT, o qual é reduzido nas membranas das mitocôndrias de células vivas, resultando na coloração azulada. (a) Placa de *E. coli* antes da revelação com MTT; a seta aponta a região contendo metabólitos arrastados pelo solvente. (b-c) Placas de *E. coli* após revelação com MTT; é possível observar a zona de inibição bacteriana, a qual aparece como uma região clara em meio ao fundo azulado. (d-e) Placas de *C. albicans* reveladas com MTT

4.2.2.3 Variabilidade da atividade antimicrobiana de linhagens endofíticas de *Epicoccum* e comparação com a variação genética

A relação entre os isolados foi avaliada por meio de análise fenética com base nos dados combinados dos testes fisiológicos, a qual resultou no dendrograma representado na Figura 4.7b. Como pode ser observado, não foi verificada correlação entre origem, substrato ou hospedeiro dos endófitos e capacidade inibitória de microrganismos patogênicos. Esta análise revelou que extensa variação na atividade biológica pode ser encontrada mesmo entre isolados de um único local e hospedeiro, como é o caso dos isolados avaliados, dos quais 94,64% foram provenientes de cana-de-açúcar da região de Piracicaba, São Paulo. Para verificar se existe correlação entre diversidade genética e atividade antimicrobiana, o presente trabalho comparou os dados de atividade antimicrobiana dos três testes realizados (pareamento, blocos de ágar e difusão em ágar

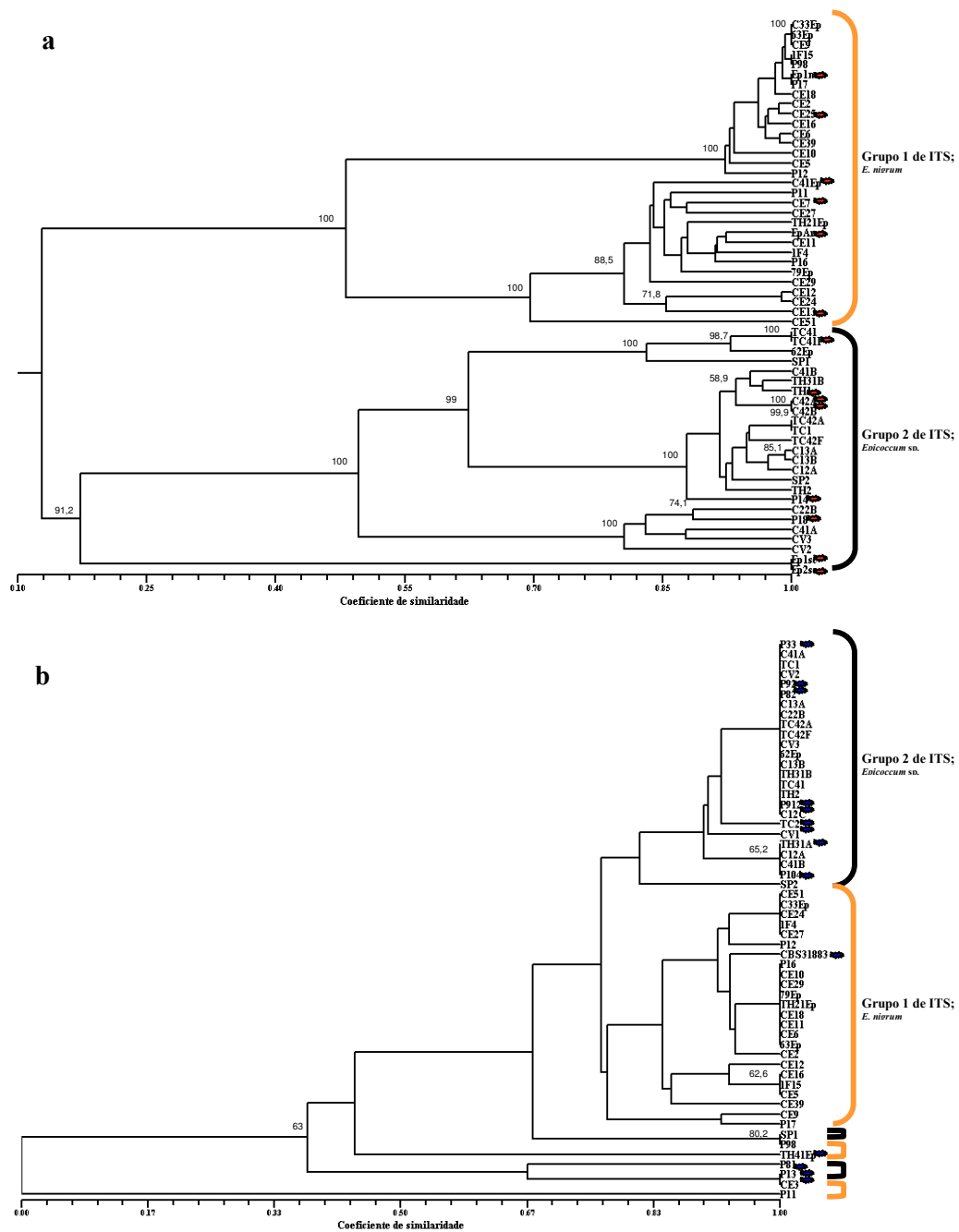


Figura 4.7 – Comparação entre diversidade genética e atividade antimicrobiana de isolados endofíticos de *Epicoccum*. **(a)** Dendrograma gerado pela análise de marcadores AFLP (capítulo 2); o grupo destacado em laranja apresenta seqüência de ITS semelhante entre si, e o grupo destacado em preto apresenta seqüência de ITS semelhante entre si (capítulo 2); as linhagens marcadas em vermelho não foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana. **(b)** Dendrograma gerado pela análise da atividade antimicrobiana por três testes fisiológicos (pareamento, blocos de ágar e difusão em ágar); as linhagens marcadas em azul não foram avaliadas por marcadores AFLP, mas foram avaliadas por seqüência de ITS (capítulo 2); as linhagens destacadas em laranja correspondem ao grupo 1 da análise molecular (de AFLP ou ITS demonstrado em (a)), e as linhagens destacadas em preto correspondem ao grupo 2 da análise molecular (de AFLP ou ITS). Coeficiente de similaridade de Dice; *bootstrap* = 1000

semi-sólido) com dados de marcadores AFLP e seqüências de ITS obtidos previamente (capítulo 2). Como pode ser notado nos dendrogramas da Figura 4.7 e nas Tabelas 4.2 e 4.3, de modo geral as linhagens geneticamente similares entre si também apresentaram espectro similar de atividade antimicrobiana, embora exceções tenham ocorrido. Por exemplo, a linhagem P11, a qual não produziu zona de inibição microbiana nos três testes fisiológicos, é geneticamente bastante similar às linhagens produtoras. Por outro lado, as linhagens SP1 e P98 são geneticamente divergentes, mas apresentaram o mesmo perfil fisiológico (Figura 4.7).

Conforme apresentado no capítulo 2, as linhagens endofíticas de *Epicoccum* foram separadas em espécies distintas por meio de abordagem polifásica, a qual incluiu extensa análise molecular, morfocultural, enzimática e de compatibilidade vegetativa. Os dados de atividade antimicrobiana reforçam as diferenças anteriormente relatadas para este grupo de linhagens por outras abordagens. Além disso, é possível sugerir que marcadores moleculares como AFLP podem ser ferramentas importantes em programas de *screening* de linhagens quanto à produção de compostos bioativos, direcionando a escolha de genótipos divergentes e reduzindo o número de isolados a serem investigados quimicamente de modo a garantir que metabólitos novos ou com espectro de ação distinto sejam recuperados com maior freqüência.

A importância da análise da variação intraespecífica para descoberta de produtos naturais bioativos em fungos foi destacada por Möller, Weber e Dreyfuss (1996). Estes autores avaliaram uma grande coleção de isolados de *Chaunopycnis alba*, provenientes de diversas regiões, por meio do perfil de HPLC e outras características, em comparação com marcadores RAPD. Os autores verificaram uma correlação entre diversidade genética e perfil metabólico, e demonstraram que linhagens provenientes de regiões tropicais apresentaram maior número de metabólitos novos, em comparação às linhagens de regiões temperadas, salientando a importância da inclusão desta abordagem em programas de busca por compostos bioativos.

Correlação semelhante foi relatada por Talbot, Vincent e Wildman (1996) quando analisaram a influência do genótipo e do ambiente sobre a diversidade fisiológica e metabólica de *F. compactum*. Em muitos casos, a dificuldade logística para obtenção de linhagens de diferentes locais pode dificultar este tipo de análise. Neste contexto, a utilização de dados moleculares pode auxiliar a maximização da informação sobre linhagens de uma mesma espécie em um mesmo local. Seymour et al. (2004) efetivamente demonstraram que a seleção baseada em marcadores RAPD de linhagens dos fungos endofíticos *Cylindrocarpon destructans* e *Heliscus lugdunensis*,

obtidas das raízes de uma única planta, resultou na detecção de um maior número de metabólitos novos, do que quando a seleção e análise foram realizadas indiscriminadamente.

Poucos trabalhos avaliaram o potencial de isolados endofíticos de *Epicoccum* quanto à atividade antimicrobiana ou outras atividades biológicas e geralmente relataram a análise de um pequeno número de linhagens de plantas de clima temperado (PELÁEZ et al., 1998; JANEŠ et al., 2007; CAMPANILE; RUSCELLI; LUISI, 2007). Arenal et al. (2002) avaliaram a diversidade fenotípica e genética de 36 isolados de *E. nigrum* de diferentes regiões e substratos, e também relataram grande variação no perfil de HPLC dos metabólitos secundários deste fungo. No presente trabalho um grande número de isolados endofíticos de *Epicoccum* de cana-de-açúcar foi avaliado quanto à atividade antifúngica e antibacteriana por diferentes testes fisiológicos revelando extensa variação nesta atividade mesmo entre isolados de um único local e hospedeiro e que plantas de cana-de-açúcar contêm microrganismos que são antagonistas naturais de fungos e bactérias patogênicas.

O estudo do metabolismo secundário de fungos endofíticos é importante, não somente do ponto de vista aplicado, mas também para o entendimento da função destes metabólitos durante a interação endofítica, e na interação com outros microrganismos associados às plantas. Em algumas associações, foi verificado que a expressão de genes envolvidos na síntese dos metabólitos ergovalina e lolitremos é baixa no micélio, mas alta durante a interação com a planta, sugerindo que vias de sinalização da planta regulam a produção de alcalóides pelos endófitos, como demonstrado para *Neotyphodium lolii* e *Epicloe festucae* em interação com gramíneas de clima temperado (YOUNG et al., 2006). O estudo do metabolismo secundário de fungos endofíticos é bastante avançado no grupo de endófitos clavicipitáceos que colonizam algumas gramíneas de clima temperado, e conferem vantagem à planta pela produção de alcalóides tóxicos que são repelentes à insetos herbívoros (AZEVEDO et al., 2000; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004).

No entanto, para os endófitos não clavicipitáceos, pouco é conhecido sobre a função de metabólitos secundários na interação endofítica (SCHULZ et al., 1999; SCHULZ; BOYLE, 2005) e poucos trabalhos têm investigado efetivamente se os compostos que são produzidos *in vitro* são também produzidos *in planta* (MILLER et al., 2002), ou se conferem algum benefício direto à planta hospedeira (SCHULZ; BOYLE, 2005). Por exemplo, Weber et al. (2004) verificaram que *Phoma medicaginis* foi o endófito dominante nos ramos de *Medicago sativa*. O

composto antifúngico brefeldina A foi isolado das culturas deste fungo endofítico. Os autores não detectaram este composto em tecidos frescos coletados de plantas pré-inoculadas, mas detectaram alta concentração deste antifúngico após a senescência e morte, em câmara úmida, dos tecidos coletados, demonstrando o possível envolvimento deste metabólito na defesa do substrato após a mudança do estado endofítico para saprofítico no ciclo de vida de *P. medicaginis*, em consequência da morte do hospedeiro.

Embora considerável avanço no conhecimento da regulação e síntese de metabólitos secundários de fungos filamentosos tenha sido alcançado nos últimos anos (SHWAB; KELLER, 2008; FOX; HOWLETT, 2008), muito ainda precisa ser conhecido a nível molecular para que abordagens de biossíntese combinatória sejam aplicáveis aos fungos (STADLER; KELLER, 2008), como efetivamente demonstrado para bactérias (FLOSS, 2006). A riqueza de metabólitos produzidos por fungos endofíticos (GUNATILAKA, 2006; ZHANG; SONG; TAN, 2006) pode refletir também novas funções enzimáticas envolvidas na síntese destes compostos. Abordagens de *screening* de endófitos para descoberta de novas atividades biológicas, associadas ao uso de diferentes técnicas de biologia molecular, demonstram a importância destes organismos não somente como fonte de novas moléculas, mas também como fonte de novas funções enzimáticas envolvidas na regulação e síntese de metabólitos de interesse.

4.2.2.4 Mutagênese insercional mediada por *A. tumefaciens* e caracterização da biblioteca de agrotransformantes

Além de avaliar uma coleção de isolados endofíticos de *Epicoccum* quanto à atividade antimicrobiana, o presente trabalho teve por objetivos obter uma biblioteca de transformantes por meio de transferência gênica mediada por *A. tumefaciens*, visando à identificação de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários com atividade biológica. Os resultados dos experimentos de transformação e da análise fenotípica dos transformantes das linhagens P16 e TH2 estão sumarizados na Tabela 4.5. Utilizando as condições otimizadas no capítulo 3, a frequência de transformação foi de 52 e 28 colônias resistentes a higromicina por 1×10^5 conídios germinados das linhagens P16 e TH2, respectivamente. A metodologia de difusão em ágar semi-sólido aplicada para caracterização dos transformantes foi bastante efetiva (Figura 4.8), sendo possível analisar centenas de linhagens em um espaço de tempo relativamente curto e com alta reprodutibilidade. O ensaio de atividade antimicrobiana revelou que 8,52% dos

transformantes da linhagem P16 perderam a atividade inibitória contra todos os seis microrganismos patogênicos testados (*C. albicans*, *X. albilineans*, *M. luteus*, *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis*). Para a linhagem TH2 esta porcentagem foi de 20,42% para os quatro patógenos avaliados (*S. aureus*, *B. subtilis*, *X. albilineans* e *M. luteus*).

Embora seja difícil comparar estes resultados com os dados da literatura, devido à utilização de diferentes metodologias de *screening*, esta frequência foi bastante superior à reportada para outros fungos onde a mutagênese insercional por *A. tumefaciens* foi aplicada para geração de mutantes alterados no metabolismo secundário. Por exemplo, para o patógeno humano *Cryptococcus neoformans* 0,16% dos transformantes foram incapazes de produzir melanina, a qual é um fator de patogenicidade para este fungo (WALTON; IDNURM; HEITMAN, 2005); para *Ophiostoma piceae* 1,2% dos mutantes avaliados perderam a pigmentação característica da espécie (TANGUAY; TANGEN; BREUIL, 2007); para o fitopatógeno *Ascochyta rabiei* 2,4% das linhagens apresentaram redução significativa na produção da fitotoxina solanapirona (MOGENSEN; CHALLEN; STRANGE, 2006); para o fungo micotoxigênico *Aspergillus westerdijkiae* 1,3% das linhagens mostraram redução da produção de ocratoxina (MATA et al., 2007); para o agente de biocontrole *Coniothyrium minitans* 0,025% dos transformantes caracterizados perderam a atividade antibacteriana (LI et al., 2005). Em relação aos fungos fitopatogênicos, frequências semelhantes foram relatadas quanto à perda da patogenicidade à planta hospedeira. Por exemplo, para *Leptosphaeria maculans*, *Colletotrichum higginsianum*, *Magnaporthe grisea*, *M. oryzae* e *C. acutatum* estas frequências foram 3,9% , 0,45%, 0,38%, 0,96% e 0,33%, respectivamente (BLAISE et al., 2007; HUSER et al., 2009; BETTS et al., 2007; JEON et al., 2007; TALHINHAS et al., 2008).

Embora o presente trabalho tenha sido voltado para seleção de transformantes incapazes de formar zona de inibição contra patógenos, também foi verificado que alguns transformantes da linhagem TH2 (0,83%) apresentaram zona de inibição significativamente superior à linhagem selvagem, para todos os patógenos testados (Tabela 4.5). Além disso, foi possível observar variação morfológica (Figura 4.9), como a perda da coloração alaranjada e marrom característica das linhagens P16 e TH2, respectivamente, bem como taxas de crescimento e conidiação reduzidas em meio de cultura BDA, para muitos transformantes (dados não mostrados). A estabilidade dos 128 transformantes não inibidores foi avaliada pela passagem por cinco vezes sucessivas em meio sem higromicina B, através de purificação a partir das extremidades das

Tabela 4.5 – Transformação mediada por *A. tumefaciens*^(a) de duas linhagens endofíticas de *Epicoccum* e caracterização dos transformantes quanto à alteração da atividade antimicrobiana

Linhagens	Número de transformantes		Atividade antimicrobiana dos transformantes ^(b)		
	Obtidos	Caracterizados	Diminuída	Aumentada	Ausente ^(c)
P16 (<i>E. nigrum</i>)	472	352	16*	-	30
TH2 (<i>Epicoccum</i> sp.)	535	480	32*	4*	98

(a) A transformação foi realizada utilizando a linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* contendo o vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003), e a seleção dos transformantes foi realizada pela resistência a higromicina B, conforme descrito no capítulo 3 desta tese. (b) A atividade antimicrobiana dos transformantes foi testada em duplicata contra diferentes microrganismos patogênicos, por meio do teste de difusão em ágar semi-sólido. (c) Representa o número de transformantes que perdeu completamente a capacidade inibitória contra todos os patógenos testados, após a segunda etapa de caracterização. (*) Representa diminuição ou aumento significativo (a 5% de significância) do tamanho da zona de inibição em comparação às linhagens selvagens, com base na média de duas repetições.

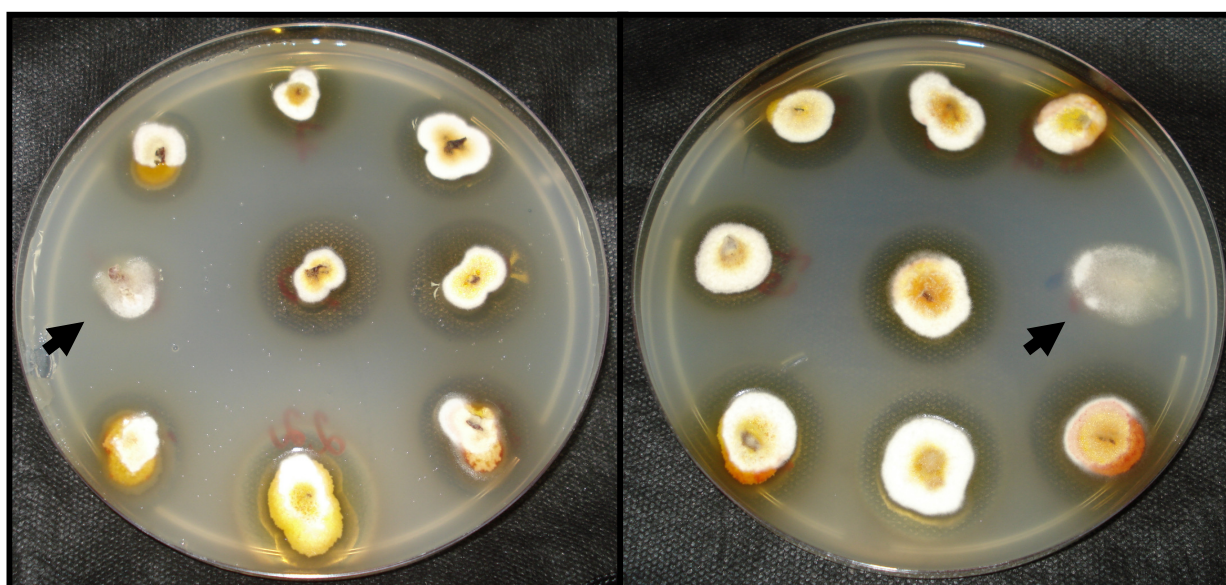


Figura 4.8 – Exemplos das placas de caracterização de transformantes da linhagem P16 de *E. nigrum*. É possível visualizar dois transformantes (setas) que perderam a capacidade de formação de zona de inibição contra a levedura *C. albicans*

hifas. Todos os transformantes mantiveram a resistência a higromicina B quando crescidos na presença deste antibiótico. Mutantes de *E. nigrum* têm sido obtidos com agentes químicos (N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina, NTG), visando à seleção de mutantes com maior produção de pigmentos carotenóides e flavonóides antioxidantes por linhagens promissoras para a indústria de corantes alimentícios (BARBU et al., 2006). No presente trabalho, foi demonstrado que a mutagênese mediada por *A. tumefaciens* é uma abordagem bastante útil para geração de mutantes

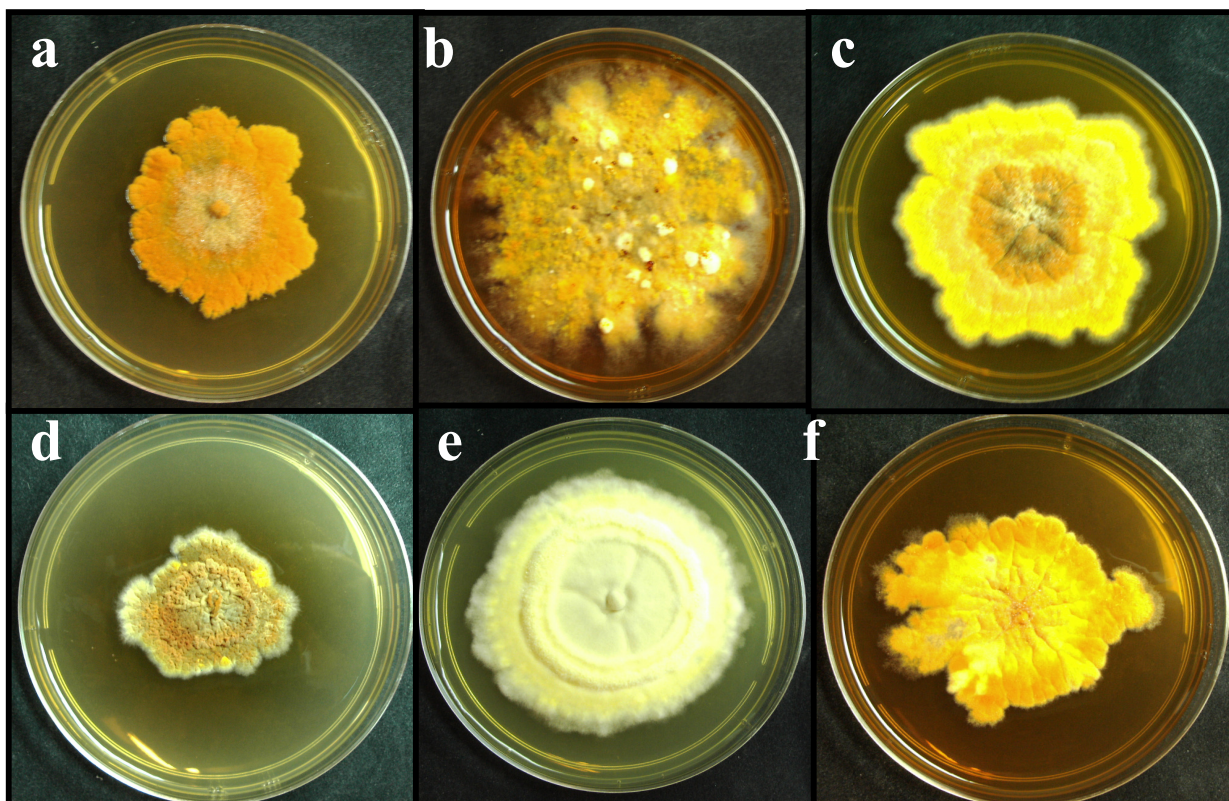


Figura 4.9 – Características da colônia de alguns transformantes da linhagem P16 de *E. nigrum* após 10 dias de crescimento em meio de cultura BDA a 28°C. A linhagem selvagem é apresentada em **b**. (**a**, **c**, **d**, **e**, **f**) representa as linhagens P16-120, P16-31, P16-49, P16-150 e P16-13, respectivamente

alterados no metabolismo secundário nesta espécie, além de constituir um dos primeiros exemplos de aplicação desta metodologia para fungos endofíticos não clavicipitáceos, visando à identificação de genes envolvidos na produção de metabólitos bioativos.

4.2.2.5 Análise dos transformantes não inibidores e identificação das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA por TAIL-PCR

A confirmação da transformação foi verificada pela amplificação de um fragmento de aproximadamente 600 pb, correspondente ao gene *hph*, a partir do DNA genômico dos 128 transformantes não inibidores (dados não mostrados). A técnica TAIL-PCR foi aplicada visando à identificação das junções entre o T-DNA e o genoma dos transformantes (Figura 4.10). A Tabela 4.6 representa a eficiência de amplificação obtida com diferentes combinações de primers arbitrários e específicos para as bordas do T-DNA. O tamanho dos produtos de amplificação das reações terciárias variou de 250 a 2000 pb.

Tabela 4.6 – Eficiência da amplificação^(a) por TAIL-PCR das regiões flanqueadoras do T-DNA de transformantes de *Epicoccum* que perderam a atividade antimicrobiana

Linhagem	Nº avaliado de mutantes não inibidores	Borda esquerda (LB)			Borda direita (RB)			Nº de reações positivas
		AD1	AD2	AD3	AD1	AD2	AD3	
P16	30	1	23	-	-	-	-	24
TH2	98	-	21	31	-	-	16	68

(a) Refere-se ao número de linhagens para as quais as reações terciárias de TAIL-PCR resultaram em produtos de amplificação visíveis em gel de agarose. AD1, AD2 e AD3 são os primers arbitrários e degenerados (LIU et al., 1995) utilizados em combinação com primers específicos construídos para as regiões das bordas esquerda e direita do T-DNA do vetor pFAT-gfp, conforme descrito no capítulo 3 desta tese.

As reações terciárias de TAIL-PCR foram positivas para 24 mutantes da linhagem P16, no entanto, produtos de amplificação únicos foram verificados apenas para 14 mutantes. Para a linhagem TH2, reações positivas foram verificadas para 68 mutantes, sendo que 53 resultaram em produtos de PCR únicos. Não foi possível amplificar ambas as bordas de um mesmo transformante, ou seja, as linhagens para as quais a amplificação foi positiva para uma das bordas não puderam ser amplificadas na outra borda, mesmo utilizando todas as combinações possíveis de primers. A eficiência da técnica TAIL-PCR é amplamente reconhecida para análise de mutantes insercionais de fungos (MULLINS et al., 2001; BLAISE et al., 2007), no entanto, outras abordagens como PCR inverso também são utilizadas (MENG et al., 2007; HUSER et al., 2009) e podem ser uma alternativa para recuperação das seqüências flanqueadoras dos mutantes de *Epicoccum* que não puderam ser amplificados por TAIL-PCR.

A análise das seqüências flanqueadoras do T-DNA dos mutantes das linhagens P16 e TH2 está sumarizada na Tabela 4.7. Em 9 dos 14 mutantes da linhagem P16 foi verificado que a região flanqueadora do T-DNA correspondeu à seqüência do próprio vetor pFAT-gfp, mostrando que nestas linhagens a inserção não foi somente do T-DNA, mas também do vetor binário (Figura 4.11). Não foi possível determinar as seqüências flanqueadoras do T-DNA desses transformantes porque a seqüência do plasmídeo ultrapassou 600 pb de tamanho. Apesar disso, a análise de *Southern blot* de 2 desses transformantes (P16-31 e P16-49) mostrou que eles apresentaram inserções únicas do T-DNA em posições distintas no genoma (Figura 4.12). Isto sugere que a perda da atividade antimicrobiana destes dois mutantes foi relacionada à inserção do T-DNA. Também foi possível observar alteração morfológica e taxa de crescimento reduzida para o mutante P16-49, revelando efeitos pleiotrópicos da inserção do T-DNA nesta linhagem (Figura 4.9d). Para os demais mutantes da linhagem P16, a análise de seqüências (Tabela 4.7)

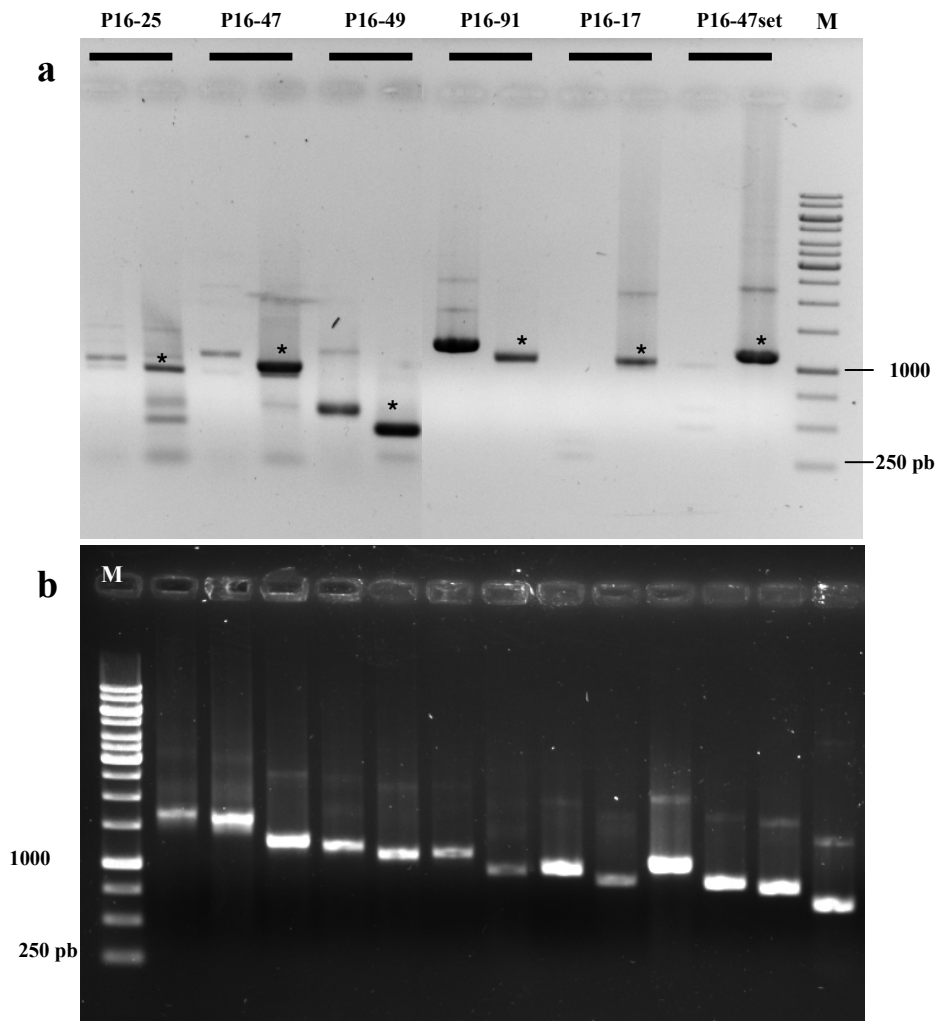


Figura 4.10 – Produtos de amplificação gerados por TAIL-PCR para mutantes de *Epicoccum* que perderam a capacidade inibitória contra microrganismos patogênicos. **(a)** Mutantes da linhagem P16 de *E. nigrum*. As reações secundária e terciária são mostradas para cada mutante; os asteriscos indicam as junções do T-DNA com o genoma do fungo. **(b)** Mutantes de linhagem TH2 de *Epicoccum* sp. Os produtos das reações terciárias são representados para 13 mutantes. **(M)** Marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil)

revelou elevada similaridade com proteínas hipotéticas de fungos contendo domínios conservados sem uma função conhecida (P16-25 e P16-47) e também com proteínas hipotéticas de outros organismos as quais contêm domínios conservados com diferentes funções celulares, como representado pelas superfamílias de citocromo b_N_ e helicases (P16-17, P16-47set e P16-91). Também foi possível detectar a presença de ORFs putativas nas seqüências de alguns transformantes, as quais apresentaram elevada similaridade com proteínas de outros organismos. A análise de *Southern* revelou a presença de uma única cópia do T-DNA para o mutante P16-25,

a

pFAT-gfp P16-25 120 pb
 cctcgttacatcagctcgcagctacccccctggctcgacatcaacaatgtccgacacaccactgccaccatgcacaatggcccacgccaagcttggcgccagccggcttccaattcagt
 cctcgttacatcagctcgcagctacccccctcgcggtgatatataaacctctccgcaactcgtttctctccagcagctactcaccacagtcctctttcacatgtagattcccacctcct

pFAT-gfp P16-25 240 pb
 acattaaaaacgtccgcaatgtgttattaagttgtctaagcgtcaatttGTTTACACCACAATATATCCTGCCaccagccagccaacagctccccgaccggcagctcggcacaaaatcat
 gcccctctgaccctccggaccgagcatccccatctccggaactgctaaccggtccgctccgcccggccctacatccccagcccaaacataggctccgcgcaaggcggaagt

b

pFAT-gfp P16-47set 120 pb
 cctcgttacatcagctcgcagctacccccctggctcgacatcaacaatgtccgacacaccactgccaccatgcacaatggcccacgccaagcttggcgccagccggcttccaattcagt

pFAT-gfp P16-47set 240 pb
 acattaaaaacgtccgcaatgtgttattaagttgtctaagcgtcaatttGTTTACACCACAATATATCCTGCCaccagccagccaacagctccccgaccggcagctcggcacaaaatcat
 -----cgtccgcaatgtgttattaagttgtctaagcatccgaactaggaagatattaccacacagcttgcgcttggagccttcattgtatccatactggacaagagtctggttg

c

pFAT-gfp P16-49 120 pb
 cctcgttacatcagctcgcagctacccccctggctcgacatcaacaatgtccgacacaccactgccaccatgcacaatggcccacgccaagcttggcgccagccggcttccaattcagt

pFAT-gfp P16-49 240 pb
 acattaaaaacgtccgcaatgtgttattaagttgtctaagcgtcaatttGTTTACACCACAATATATCCTGCCaccagccagccaacagctccccgaccggcagctcggcacaaaatcat
 -----atttgtttacaccacaatatatcctgccaccagccagccaacagctccccgaccggcagctcggcacaaaatcat

Figura 4.11 – Exemplos do padrão de inserção do T-DNA no genoma de três mutantes da linhagem P16 de *E. nigrum* que perderam a atividade antimicrobiana. O esquema mostra a comparação da seqüência dos mutantes P16-25 (a), P16-47set (b) e P16-49 (c) com a seqüência (5'-3') de uma região de 240 pb da borda esquerda do T-DNA do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003). A seqüência da borda esquerda (LB) está representada em letras maiúsculas sublinhadas. A região comum entre as seqüências dos mutantes e do vetor binário está sombreada em cinza. As regiões flangeadoras dos mutantes estão representadas em negrito itálico. É possível notar que uma grande região do T-DNA foi perdida na integração do mutante P16-25 (a). No mutante P16-47set (b) a seqüência da borda esquerda mais 8 pb foi perdida. Para o mutante P16-49 (c), foi possível recuperar a borda esquerda intacta, mas a região flangeadora correspondeu à seqüência do vetor pFAT-gfp

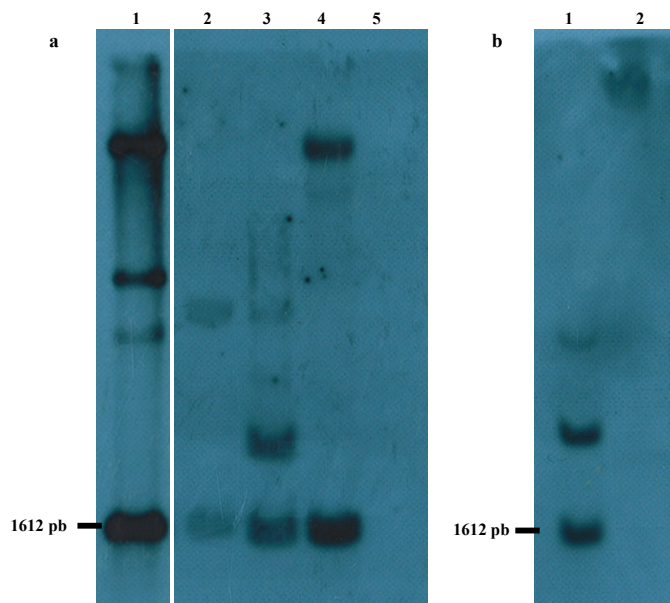


Figura 4.12 – Análise de *Southern blot* de alguns mutantes da linhagem P16 de *E.nigrum* que perderam a atividade antimicrobiana. **(a)** 1-5 representa o vetor pFAT-gfp, linhagens P16-25, P16-31, P16-49 e P16 selvagem, respectivamente. **(b)** 1 - linhagem P16-47; 2 – linhagem P16 selvagem. Devido à presença de dois sítios de restrição de *EcoRI* na região T-DNA (um deles dentro do gene *hph* utilizado como sonda), a presença de um fragmento de 1612 pb é observada para todas as amostras, e dois sinais de hibridização correspondem à inserção de uma cópia do T-DNA

sugerindo que a ausência de atividade antimicrobiana nesta linhagem foi relacionada à inserção do T-DNA e inativação de genes específicos para os quais uma função ainda não tinha sido associada (Figura 4.12, Tabela 4.7).

Uma alta frequência de inserção do vetor binário também foi verificada para os mutantes da linhagem TH2. Neste caso, de 27 seqüências avaliadas, 21 corresponderam à seqüência do vetor pFAT-gfp. Entre as outras 6 linhagens, foi possível observar elevada similaridade com seqüências de proteínas hipotéticas de fungos contendo domínios conservados envolvidos em funções como regulação da transcrição, transporte de diferentes compostos e outras atividades enzimáticas (Tabela 4.7). Como a análise de *Southern blot* não foi realizada para todos os mutantes, não é possível concluir se o fenótipo observado foi consequência da inativação dos genes identificados por TAIL-PCR. Neste caso, outras análises são necessárias, como por exemplo, a complementação da linhagem mutante com a seqüência dos genes identificados, ou a análise por meio de interrupção gênica da linhagem selvagem, para confirmação do envolvimento destes genes na atividade antimicrobiana de *E. nigrum*. Em todo caso, um aspecto interessante deste trabalho é que a atividade antimicrobiana de todos os mutantes avaliados molecularmente

Tabela 4.7 – Análise das seqüências flanqueadoras do T-DNA de mutantes de *Epicoccum* que perderam a capacidade de inibição de microrganismos patogênicos

Mutante	Southern	BlastX	Domínios conservados	ORFs
P16-25	1 cópia	Proteína hipotética PADG_02699 (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18); EEH46601; Ident. = 50%; E value = 0,22.	-	-
P16-17	NT	Apocitocromo b6 (<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645); EAQ77017; Ident. = 36%; E value = 1,3.	cl00191: Superfamília Citocromo b_N_	-
P16-47	2 cópias	Proteína hipotética conservada (<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP); EDU47157; Ident. = 65%; E value = 1e ⁻⁰⁸	pfam08432: Superfamília DUF1742; família de proteínas de fungos de função desconhecida.	cl00357: Superfamília aciltransferase
P16-47set*	NT	Similar ao precursor de proteína do tipo dedo de zinco (RING finger protein 203) (<i>Danio rerio</i>); XP_684807.3; Ident. = 27%; E value = 0,054	cl09104: Superfamília RING; proteínas do tipo dedo de zinco, envolvidas em interações do tipo proteína-proteína e outros	COG1201: Helicases semelhantes à Lhr
P16-91	NT	Proteína hipotética de função desconhecida (<i>Leishmania infantum</i> JPCM5); CAM66479; Ident. = 27%; E value = 0,83	-	COG1201: Helicases semelhantes à Lhr. cl09925: Superfamília de proteínas kinases
TH2-226	NT	Proteína hipotética SNOG_03559 (<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15); EAT88764.2; Ident. = 57%; E value = 8e ⁻³⁶	pfam00264: Superfamília tirosinase; domínio comum da tirosinase; esta família também contém polifenol oxidases	Pfam00264: Superfamília tirosinase
TH2-158	NT	Proteína hipotética SNOG_09436 (<i>P. nodorum</i> SN15); EAT83628.2; Ident. = 68%; E value = 3e ⁻²⁶	cl00068: Superfamília GAL4; domínio de ligação a DNA do tipo Zn2Cys6 encontrado em reguladores da transcrição semelhantes à GAL4	cl00068: Superfamília GAL4
TH2-52	NT	Proteína hipotética SNOG_08647 (<i>P. nodorum</i> SN15); EAT83815.2; Ident. = 60% E value = 5e ⁻⁰⁴	cl09119: Superfamília MFS; grande e diverso grupo de transportadores do tipo uniporte, simporte e antiporte, atuam no transporte intracelular de diversas moléculas e drogas	cl09119: Superfamília MFS cl00509: Superfamília hot_dog; proteínas acil carreadoras do metabolismo de ácidos graxos
TH2-126	NT	Proteína Zgc:113944 (<i>Danio rerio</i>); AAH67650.1; Ident. = 28%; E value = 0,82	-	cl00101: KU Super-family BPTI/Kunitz family of serine protease inhibitors
TH2-169	NT	Não há similaridade	-	-
TH2-105	NT	Receptor de cobalamina (<i>Desulfohalobium retbaense</i> DSM 5692); ZP_03902721.1; Ident. = 36%; E value = 0,49	cl00284: Superfamília de canais OM (superfamília das porinas)	-

(NT): não testado. (*) O mutante P16-47set foi obtido por transformação mediada por *A. tumefaciens* durante o procedimento de otimização descrito no capítulo 3 desta tese, e não foi incluído no cálculo de porcentagem de mutantes não inibidores descrito neste trabalho, mas foi incluído nas caracterizações fenotípicas.

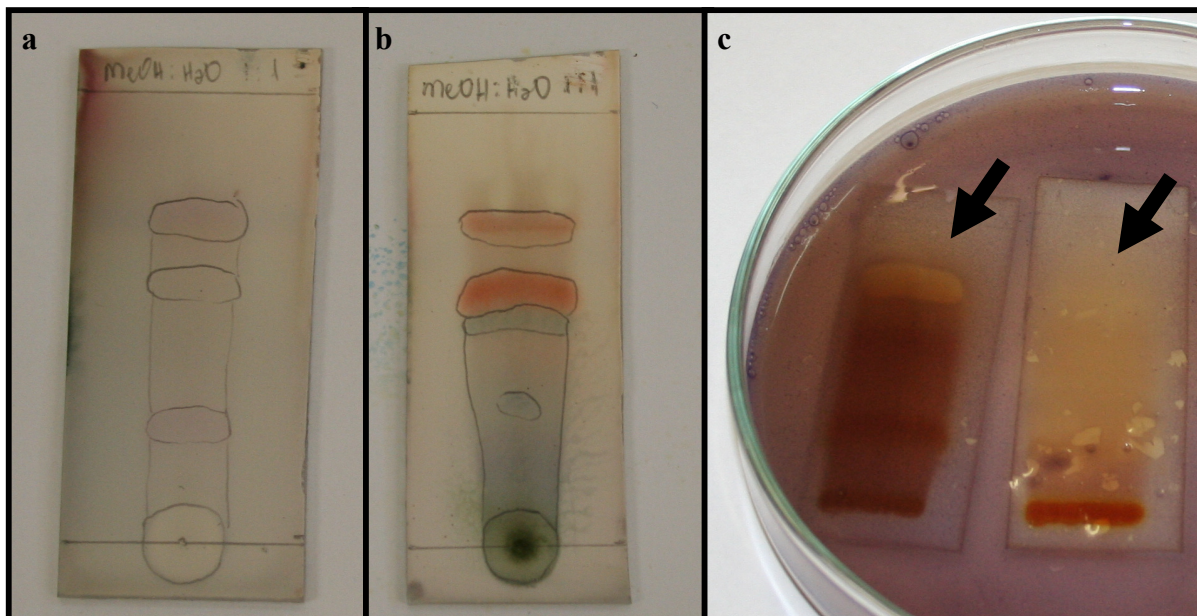


Figura 4.13 – **(a-b)** Perfil cromatográfico (cromatografia de camada delgada em fase reversa) do extrato de acetato de etila da linhagem selvagem P16 **(a)** e do mutante P16-47set **(b)** obtido após 60 dias de cultivo em meio de cultura caldo batata. As placas cromatográficas foram desenvolvidas em metanol:água (1:1). É possível observar a presença de “spots” diferenciados no mutante **(b)**, que foram ausentes no selvagem **(a)**. **(c)** Exemplo do ensaio de bioautografia (CCD em fase reversa) dos extratos da linhagem selvagem (esquerda) e P16-47set (direita). A seta à esquerda indica a região de inibição de *E. coli*, a qual aparece como uma zona clara após revelação com MTT, pela linhagem selvagem P16. A seta à direita indica a ausência desta zona de inibição no extrato do mutante P16-47set

foi perdida contra todos os microrganismos patogênicos testados (fungos, bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas), evidenciando que vias essenciais comuns do metabolismo secundário foram afetadas nestes mutantes.

No entanto, a ausência de atividade antimicrobiana medida por testes de difusão em ágar não demonstra a incapacidade da linhagem em produzir compostos antimicrobianos, como foi visto anteriormente para alguns isolados selvagens de *Epicoccum*, os quais não inibiram nenhum dos microrganismos patogênicos em testes de difusão em ágar, mas apresentaram atividade biológica no extrato orgânico. Nesse contexto, para melhor caracterização dos transformantes não inibidores, o presente trabalho realizou testes bioquímicos preliminares do extrato orgânico de alguns mutantes da linhagem P16 (Figura 4.13). A análise do perfil cromatográfico, por meio de cromatografia de camada delgada (em fase reversa) bem como ensaios de bioautografia (Figura 4.13), demonstrou a presença de compostos distintos (“spots”) no extrato de acetato de etila do mutante P16-47set, crescido nas mesmas condições que a linhagem selvagem. Também foi possível observar características distintas do extrato do mutante, como coloração diferenciada,

bem como ausência de atividade antimicrobiana nos ensaios de bioautografia contra diferentes microrganismos patogênicos, em comparação à linhagem selvagem P16. Ensaio bioquímico estão em andamento para determinação da natureza dos compostos produzidos por *E. nigrum* selvagem, os quais foram perdidos neste mutante, e também nos mutantes P16-25, P16-17, P16-47 e P16-91. Esta análise bioquímica, juntamente com a determinação do número de cópias do T-DNA, auxiliará o entendimento das funções dos genes identificados por TAIL-PCR na síntese de metabólitos bioativos pelo fungo endofítico *E. nigrum*.

De modo geral, os resultados do presente trabalho demonstraram extensa variação da atividade antimicrobiana entre diferentes isolados endofíticos de *Epicoccum*, mesmo a partir da análise de um único local e planta hospedeira, a qual foi correlacionada com a variação genética deste grupo de isolados. Além disso, foi demonstrado que a mutagênese insercional aleatória mediada por *A. tumefaciens*, associada com análises bioquímicas, constitui uma abordagem eficiente para auxiliar a identificação de genes envolvidos no metabolismo secundário de fungos endofíticos, e também contribuindo para a determinação de funções de genes hipotéticos previstos nos projetos de seqüenciamento e anotação de genomas de fungos filamentosos.

Referências

- ABDEL-LATEFF, A.; FISCH, K. M.; WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G. M. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 831-834, 2003.
- ARENAL, F.; PLATAS, G.; MARTÍN, J.; ASENSIO, F.J.; SALAZAR, O.; COLLADO, J.; VICENTE, F.; BASILIO, A.; RUIBAL, C.; ROYO, I.; DE PEDRO, N.; PELÁEZ, F. Comparison of genotypic and phenotypic techniques for assessing the variability of the fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 36-45, 2002.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 1-36, 2000.
- BAHRIM, G.; ŞOPTICĂ, F. Correlative effect of solid media on yellow pigmentogenesis at an *Epicoccum* sp. Strain. **Roumanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 9, p. 757-762, 2004.
- BAMFORD, P. C.; NORRIS, G. L. F.; WARD, G. Flavipin production by *Epicoccum* spp. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 44, p. 354-356, 1961.

- BARBU, V.; BAHRIM, G.; ȘOPTICĂ, F.; SOCACIU, C. Modification of pigment composition in *Epicoccum nigrum* by chemical mutagenesis. **Scientific Study & Research: Chemistry & Chemical Engineering, Food Industry**, Bacău, v. 7, p. 589-596, 2006.
- BAUTE, M. A.; DEFFIEUX, G.; BAUTE, R.; NEVEU, A. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. I. Fermentation, isolation and antibacterial properties. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 31, p. 1099–1105, 1978.
- BAYRAM, O.; KRAPPMANN, S.; NI, M.; BOK, J. W.; HELMSTAEDT, K.; VALERIUS, O.; BRAUS-STROMEYER, S.; KWON, N. J.; KELLER, N. P.; YU, J. H. et al. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. **Science**, Washington, v. 320, p. 1504-1506, 2008.
- BELL, P. J. L.; KARUSO, P. Epicoccone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 125, p. 9304-9305, 2003.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, p. 497–516, 2003.
- BERGMANN, S.; SCHUMANN, J.; SCHERLACH, K.; LANGE, C.; BRAKHAGE, A. A.; HERTWECK, C. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. **Nature Chemical Biology**, London, v. 3, p. 213-217, 2007.
- BETTS, M. F.; TUCKER, S. L.; GALADIMA, N.; MENG, Y.; PATEL, G.; LI, L.; DONOFRIO, N.; FLOYD, A.; NOLIN, S.; BROWN, D.; MANDEL, M. A.; MITCHELL, T. K.; XU, J. R.; DEAN, R. A.; FARMAN, M. L.; ORBACH, M. J. Development of a high throughput transformation system for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1035–1049, 2007.
- BILLS, G. F.; PLATAS, G.; FILLOLA, A.; JIMÉNEZ, M.R.J et al. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 1644-1658, 2008.
- BLAISE, F.; REMY, E.; MEYER, M.; ZHOU, L.; NARCY, J. P.; ROUX, J.; BALESSENT, M. H.; ROUXEL, T. A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 123-138, 2007.
- BLEOJU, M. M.; GONZÁLEZ SANJOSÉ, M. L. Study about the stability and some technological properties of the pigments synthesized by *Epicoccum nigrum*. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, Galati, v. 1, p. 37–44, 2007.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHUEMANN, J.; BERGMANN, S.; SCHERLACH, K.; SCHROECKH, V.; HERTWECK, C. Activation of fungal silent gene clusters: a new avenue to drug discovery. **Progress in Drug Research**, Basel, v., 66, p. 3-12, 2008.

BRILL, G. M.; PREMACHANDRAN, U.; KARWOWSKI, J. P.; HENRY, R.; CWIK, D. K.; TRAPHEGEN, L. M.; HUMPHREY, P. E.; JACKSON, M.; CLEMENT, J. J.; BURREN, N. S.; KADAM, S.; CHEN, R. H.; MCALPINE, J. B. Dibefurin, a novel fungal metabolite inhibiting calcineurin phosphatase activity. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 49, p. 124–128, 1996.

BROWN, A. E.; FINLAY, R.; WARD, J. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 657–664, 1987.

BRUM, M. C. P. **Potencial biotecnológico de fungos endofíticos da videira**. 2008. 95p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2008.

BURGE, W. R.; BUCKLEY, L. J.; SULLIVAN, J. D.; MCGRATTAN, C. J.; IKAWA, M. Isolation and biological activity of the pigments of the mould *Epicoccum nigrum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 24, p. 555-559, 1976.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, p. 447–459, 2002.

CAMATTI - SARTORI, V.; AZEVEDO, J. L.; SANHUEZA, R. M. V.; RIBEIRO, R. T. S.; ECHEVERRIGARAY, S. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 397-402, 2005.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 237–246, 2007.

CHAND T.; LOGAN C. Antagonists and parasites of *Rhizoctonia solani* and their efficacy in reducing stem canker of potato under controlled conditions. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 83, p. 107-112, 1984.

CHOI, H. Y.; VEAL, D. A.; KARUSO, P. Epicocconone, a new cell-permeable long Stokes' shift fluorescent stain for live cell imaging and multiplexing. **Journal of Fluorescence**, New York, v. 16, p. 475-482, 2006.

COLLEMARE, J.; BILLARD, A. BÖHNERT, H. U.; LEBRUN, M. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 207–215, 2008.

DE CAL, M. A.; LARENA, I.; LIÑÁN, M.; TORRES, R.; LAMARCA, N.; USALL, J.; DOMENICHINI, P.; BELLINI, A.; ERIBE, X. O.; MELGAREJO, P. Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, p. 592–605, 2009.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V.P. (Ed.). **The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. p. 49–80.

FERMOR, T.R.; WOOD, D.A. Degradation of bacteria by *Agaricus bisporus* and other fungi. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 126, p. 377-387, 1981.

FISCHER, B.; ANKE, H.; STERNER, O. Humilactone, a new bioactive 10-membered lactone from the fungus *Gilmaniella humicola*. **Natural Products Letters**, London, v. 7, p. 303–308, 1995.

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

FLOSS H. G. Combinatorial biosynthesis - potential and problems. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 124, p. 242-257, 2006.

FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, p. 481–487, 2008.

FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 231-240, 2008.

GLOER, J.B. The chemistry of fungal antagonism and defence. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, suppl., p. S1265–S1274, 1995.

GRIBANOVSKI-SASSU, O.; FOPPEN, F. H. The carotenoids of the fungus *Epicoccum nigrum* Link. **Phytochemistry**, Oxford, v. 6, p. 907–909, 1967.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 69, p. 509-526, 2006.

HASHEM, M.; ALI, E. H. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root rot of cotton seedlings. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 37, p. 283-297, 2004.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 447–471, 1999.

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

- ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 16, p. 218-224, 1971.
- IKAWA, M.; MCGRATTAN, C. J.; BURGE, W. R.; IANNITELLI, R. C. Epirocin, a polyene antibiotic from the mold *Epicoccum nigrum*. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 31, p. 159–161, 1978.
- ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M.C. D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 206-210, 2001.
- JANEŠ, D.; KREFT, S.; JURC, M.; SEME, K.; ŠTRUKELJ, B. Antibacterial activity in higher fungi (mushrooms) and endophytic fungi from Slovenia. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 45, p. 700–706, 2007.
- JEON, J.; PARK, S.-Y.; CHI, M.-H.; CHOI, J.; PARK, J.; RHO, H.-S.; KIM, S.; GOH, J. et al. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. **Nature Genetics**, London, v. 39, p. 561-565, 2007.
- KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 937–947, 2005.
- KEMAMI WANGUN, H. V.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C. Epicoccalone, a coumarin-type chymotrypsin inhibitor, and isobenzofuran congeners from an *Epicoccum* sp. associated with a tree fungus. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 2008, n. 22, p. 3781–3784, 2008.
- KEMAMI WANGUN, H. V.; HERTWECK, C. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 5, p. 1702–1705, 2007.
- LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 143–158, 2003.
- LANGLEY, D. Exploiting the fungi: novel leads to new medicines. **Mycologist**, Cambridge, v. 11, p. 165–167, 1997.
- LARENA, I.; TORRES, R.; DE CAL, A.; LIÑÁN, M.; MELGAREJO, P.; DOMENICHINI, P.; BELLINI, A.; MANDRIN, J. F.; LICHOU, J.; OCHOA DE ERIBE, X.; USALL, J. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. **Biological Control**, Orlando, v. 32, p. 305-310, 2005.
- LI, M.; GONG, X.; ZHENG, J.; JIANG, D.; FU, Y.; HOU, M. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, p. 323–329, 2005.

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

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

MADRIGAL, C.; TADEO, J. L.; MELGAREJO, P. Relationship between flavipin production by *Epicoccum purpurascens* and antagonism against *Monilinia laxa*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 1375-1381, 1991.

MAKI, C. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 127p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

MAPARI S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 30, p. 2183-2190, 2008.

MARI, M.; TORRES, R.; CASALINI, L.; LAMARCA, N.; MANDRIN, J. F.; LICHOU, J.; LARENA, I.; DE CAL, M. A.; MELGAREJO, P.; USALL, J. Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 1271–1277, 2007.

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

MARKHAM, J. E.; HILLE, J. Host-selective toxins as agents of cell death in plant–fungus interactions. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, p. 229–239, 2001.

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

MELGAREJO, P.; CARRILLO, R.; SAGASTA, E. Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 85, p. 313–317, 1985.

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

MENG, Y.; PATEL, G.; HEIST, M.; BETTS, M. F.; TUCKER, S. L.; GALADIMA, N.; DONOFRIO, N. M.; BROWN, D.; MITCHELL, T. K.; LI, L.; XU, J. R.; ORBACH, M.; THON, M.; DEAN, R. A.; FARMAN, M. L. A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1050-1064, 2007.

MILLER J. D.; MACKENZIE S.; FOTO M.; ADAMS G. W.; FINDLAY J. A. Needles of white spruce inoculated with rugulosin-producing endophytes contain rugulosin reducing spruce budworm growth rate. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 471-479, 2002.

MOGENSEN, E. G.; CHALLEN, M. P.; STRANGE, R. N. Reduction in solanapyrone phytotoxin production by *Ascochyta rabiei* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, p. 255–261, 2006.

MÖLLER, C.; WEBER, G.; DREYFUSS, M. M. Intraspecific diversity in the fungal species *Chaunopycnis alba*: implications for microbial screening programs. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 17, p. 359–372, 1996.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 173-180, 2001.

PELÁEZ, F.; COLLADO, F.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DIEZ MATAS, M. T.; GARCIA, J. B.; GONZALEZ DEL VAL, A.; GONZALEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNANDEZ, P.; MARTIN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 755–761, 1998.

PIECKENSTAIN, F. L.; BAZZALO, M. E.; ROBERTS, A. M. I.; UGALDE, R. A. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 77-84, 2001.

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

ROHLF, F. J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1 manual. Applied Biostatistics, New York, 2000.

ROMÃO, A. S.; ARAÚJO, W. L. Efeito do cultivo de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre a comunidade fúngica associada. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). Micologia: avanços no conhecimento. Recife: UFPE, 2007. p. 150-159.

- ROMÃO, A. S.; MENDES, R.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar geneticamente modificada. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 25., 2006, São Pedro. **Resumos...** Piracicaba: Esalq, 2006. p. 122.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 315–340, 2004.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v.106, p. 996–1004, 2002.
- SCHULZ, B.; ROMMERT, A.-K.; DAMMANN, U.; AUST, H.-J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, p. 1275-1283, 1999.
- SEYMOUR, F. A.; CRESSWELL, J. E.; FISHER, P. J.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HAAG, H.; TALBOT, N. J. The influence of genotypic variation on metabolite diversity in populations of two endophytic fungal species. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 721–734, 2004.
- SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, 225–230, 2008.
- ȘOPTICĂ, F.; BAHRIM, G. Influence of light upon flavonoid yields in *Epicoccum nigrum* solid state fermentation. **Roumanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 10, p. 2387-2394, 2005.
- SPELHAUG, S.R.; HARLANDER, S.K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, p. 856-862, 1989.
- STADLER M.; KELLER N. P. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 127–130, 2008.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 491-502, 2003.
- STUART, R. M. **Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

- TALBOT, N. J.; VINCENT, P.; WILDMAN, H. G. The influence of genotype and environment on the physiological and metabolic diversity of *Fusarium compactum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, p. 254–267, 1996.
- TALHINHAS, P.; MUTHUMEENAKSHI, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H.; SREENIVASAPRASAD, S. *Agrobacterium*-mediated transformation and insertional mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for investigating varied pathogenicity lifestyles. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 39, p. 57–67, 2008.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 8, p. 448–459, 2001.
- TANGUAY, P.; TANGEN, K.; BREUIL, C. Identifying pigmentation related genes in *Ophiostoma piceae* using *Agrobacterium*-mediated integration. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 1040-1048, 2007.
- VAGELOS, P. R. Are prescription drug prices high? **Science**, Washington, v. 252, p. 1080–1084, 1991.
- VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; et al. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria feline*. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 31, p. 1099-1103, 2008.
- WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 57, p. 1381-1386, 2005.
- WANGUN, H. V.; DAHSE, H. M.; HERTWECK, C. Epicoccamides B-D, glycosylated tetramic acid derivatives from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, p. 1800-1803, 2007.
- WEBBER J. F.; HEDGER J. N. Comparison of interactions between *Cerarocystis ulmi* and elm bark saprobes *in vitro* and *in vivo*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 86, p. 93-101, 1986.
- WEBER, R. W. S.; KAPPE, R.; PAULULAT, T.; MÖSKER, E.; ANK, H. Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, p. 886–892, 2007.
- WEBER, R. W. S.; STENGER, E.; MEFFERT, A.; HAHN, M. Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 662–671, 2004.
- WILDMAN, H. G. Influence of habitat on the physiological and metabolic diversity of fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, suppl., p. S907–S916, 1995.

WILDMAN, H. G. The rise and fall of natural products screening for drug discovery. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 13, p. 231-241, 2003.

WRIGHT, A. D.; OSTERHAGE, C.; KÖNIG, G. M. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish derived culture of *Epicoccum purpurascens*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 1, p. 507-510, 2003.

YOUNG, C. A.; FELITTI, S.; SHIELDS, K.; SPANGENBERG, G.; JOHNSON, R. D.; BRYAN, G. T.; SAIKIA, S.; SCOTT, B. A complex gene cluster for indole diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, p. 679-693, 2006.

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

ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, X. Epicoccins A–D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, p. 1522–1525, 2007.

ZHOU, T.; REELEDER, R. D. Application of *Epicoccum purpurascens* spores to control white mold of snap bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 639–642, 1989.

ZHOU, T.; REELEDER, R. D.; SPARACE, S. A. Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and *Epicoccum purpurascens*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, p. 2503-2510, 1991.