



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**PAULA DANIELLE DE SOUZA VIEIRA**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A ALGODOEIROS TRANSGÊNICO  
E NÃO-TRANSGÊNICO**

**RECIFE**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A ALGODOEIRO TRANSGÊNICO  
E NÃO-TRANSGÊNICO**

**PAULA DANIELLE DE SOUZA VIEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Neiva T. de Oliveira  
**Co-orientador:** Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

**RECIFE**  
**2010**

**Vieira, Paula Danielle de Souza**

**Fungos endofíticos associados a algodoeiros transgênico e não transgênico / Paula Danielle de Souza Vieira. – Recife: O Autor, 2010.**

**96 folhas : Il., fig., tab.**

**Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira.**

**Co-Orientador: João Lúcio de Azevedo.**

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
CCB. Biologia de Fungos, 2010.

**Inclui bibliografia.**

1. Fungos 2. Fungos – Enzimas 3. Plantas transgênicas I. Título.

**579.5**

**CDD (22.ed.)**

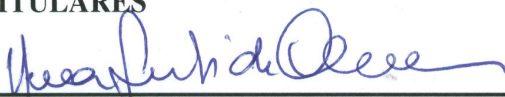
**UFPE/CCB-2010-130**

**PAULA DANIELLE DE SOUZA VIEIRA**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A ALGODOEIROS TRANSGÊNICO  
E NÃO-TRANSGÊNICO**

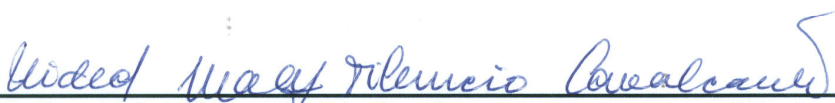
**COMISSÃO EXAMINADORA**

**MEMBROS TITULARES**



---

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Departamento de Micologia-UFPE/PE)



---

Profa. Dra. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante (Departamento de Micologia-UFPE/PE)



---

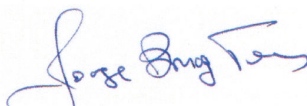
Prof. Dr. José Odair Pereira (Departamento de Biotecnologia-UFAM/AM)

**SUPLENTES**



---

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Departamento de Micologia-UFPE/PE)



---

Prof. Dr. Jorge Braz Torres (Departamento de Agronomia-UFRPE/PE)

Aprovada em: 10/02/2010

## **Agradecimentos**

A Deus que não me abandonou em nenhum momento, me dando força e coragem para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Maria de Lourdes de Paula Vieira e Leonardo de Souza Vieira, a quem devo tudo que sou hoje. Nos ensinamentos da vida, foram muito mais que mestres. Agradeço aos passos apoiados na infância, aos conselhos proferidos na adolescência e aos ensinamentos que nortearam toda a minha vida.

À Wendell Medrado, meu namorado, pelo companheirismo, amor e contínuo incentivo em todos os momentos. Pelos sábios conselhos e pelo ombro amigo de sempre.

Ao meu irmão, Leonardo de Souza Vieira Filho, pela amizade, alegria e apoio.

À minha orientadora, Profa. Dra. Neiva Tinti, pela credibilidade e confiança em mim depositadas, por sua orientação e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pelos ensinamentos, paciência e por toda ajuda no decorrer desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Braz Torres pela constante colaboração, disponibilidade do seu tempo, por toda a ajuda, paciência e amizade.

Às Profa Dra Cristina Maria de Souza Motta e Débora Maria de Massa Lima pela colaboração na identificação dos fungos isolados e pelos cuidados dispensados.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, pelas lições e conhecimentos transmitidos.

A todos os amigos de turma agradeço pelos momentos de cooperação e desconcentração vividos, e pela amizade solidificada ao longo do curso.

À Giovanna Guterrez (Secretária da Pós) pela amizade de sempre e por suas palavras de ânimo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

A todos vocês que tanto fizeram parte desta etapa da minha vida como personagens importantes, o meu eterno agradecimento e a certeza de que hoje vocês dividem comigo a felicidade desta vitória.

## RESUMO

Dentre as variedades de algodoeiro transgênico, o Bt (= *Bacillus thuringiensis*) oferece resistência aos principais lepidópteros pragas do algodoeiro por expressar a proteína Cry1Ac (=crystal protéico). Tendo em vista que a produção dessa proteína pelo vegetal geneticamente modificado pode influenciar a capacidade da planta em alocar fungos endofíticos, o objetivo do presente estudo foi investigar as possíveis alterações na composição de fungos endofíticos associados ao algodoeiro transgênico (Bt) em comparação ao não-transgênico (não-Bt). Desse modo, coletas foram realizadas nos estádios de desenvolvimento da planta. Em cada coleta foram selecionadas amostras de folhas, caules, raízes, flores e sementes de algodoeiro Bt e não-Bt, cultivados simultaneamente. Foram isolados 23 taxa de fungos endofíticos pertencentes aos grupos Zygomycota, Ascomycota, Coelomycetes, Hyphomycetes e Blastomycetes. E 17 gêneros foram encontrados: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Lecanicillium*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Talaromyces*, *Tritirachium* e *Xylaria*. As espécies mais frequentes de fungos de acordo com o órgão vegetal foram *Phomopsis archeri* em folhas e caules, *Phoma destructiva* em raízes, *Nigrospora sphaerica* em flores e *Curvularia lunata* var. *aeria* em sementes. A abundância e diversidade de fungos endofíticos associados ao algodoeiro Bt e ao não-Bt aumentam com o envelhecimento da planta, porém não houve diferença significativa entre a composição de fungos endofíticos associados aos dois tipos de algodoeiro, indicando que a expressão da proteína Cry1Ac não afeta a capacidade do algodoeiro em alocar os fungos endofíticos e que os efeitos detectados relacionados à composição da comunidade fúngica estão associados à idade e órgão da planta. A ocorrência de fungos endofíticos em sementes de algodoeiro sugere que há transmissão vertical desses microrganismos entre as plantas de uma geração para a outra. Dos fungos endofíticos obtidos, quarenta isolados foram avaliados quanto à produção qualitativa das enzimas hidrolíticas extracelulares lipase, protease e amilase. E o melhor resultado foi apresentado por isolados de *Cladosporium cladosporioides* obtidos de raiz de algodoeiro Bt e do não-Bt, que apresentaram um índice enzimático alto para duas das três enzimas testadas, sendo um microrganismo promissor a ser usado em diferentes setores da indústria biotecnológica.

**Palavras chave:** Diversidade, Fungos endofíticos, Algodão Bt.

## ABSTRACT

Among the varieties of transgenic cotton, the Bt (= *Bacillus thuringiensis*) offers resistance to major lepidopteran pests of cotton by expressing the Cry1Ac protein (= crystal protein). Considering that the production of this protein by genetically modified plant may influence the plant's capacity to allocate endophytic fungi thus the aim of this study was to investigate possible changes in the composition of endophytic fungi associated with transgenic cotton (Bt) as compared to non- transgenic (non-Bt). Thus, samples were collected in the development stages of the plant. In each collection were selected samples of leaves, stems, roots, flowers and seeds of Bt cotton and non-Bt simultaneously. It was isolated 23 taxa of endophytic fungi belonging to the groups Zygomycota, Ascomycota, Coelomycetes, Hyphomycetes and Blastomycetes and 17 genera were found: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Lecanicillium*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Talaromyces*, *Tritirachium* e *Xylaria*. The most frequent fungal species according to plants organs were *Phomopsis archeri* in leaves and stems, *Phoma destructiva* in roots, *Nigrospora sphaerica* in flowers and *Curvularia lunata* var. *aeria* in seeds. The abundance and diversity of endophytic fungi associated with Bt cotton and non-Bt increase with plant aging, but there was no significant difference between the composition of endophytic fungi associated with two types of cottons, indicating that the expression of Cry1Ac protein does not affect the ability of cotton to allocate the endophytic fungi and that the effects related to fungal community composition are associated with age and plant organ. The occurrence of endophytic fungi in cotton seeds suggests that there is vertical transmission of microorganisms between the plants from one generation to another. Endophytic fungi obtained forty isolates were evaluated for qualitative production of extracellular hydrolytic enzymes lipase, protease and amylase. The best result was presented by *Cladosporium cladosporioides* isolates obtained from root of Bt cotton and non-Bt, which had a high enzyme content for two of the three enzymes tested, and a promising microorganism to be used in different sectors the biotechnology industry.

**Keywords:** Diversity, Endophytic fungi, Bt cotton.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1.</b> Morfologia do algodoeiro ( <i>Gossypium</i> sp.). <b>A:</b> Caule cilíndrico; <b>B:</b> Raiz pivotante; <b>C:</b> Folha lobada; <b>D:</b> Flor hermafrodita; <b>E:</b> Fruto em cápsula, apresentando lóculos com sementes (Fotos: P. D. S. Vieira).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 14   |
| <b>Figura 2.</b> Localização das zonas de exclusão para o plantio de cultivares de algodoeiro geneticamente modificado. Fonte: Embrapa Algodão.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 18   |
| <b>Figura 3.</b> Frequência de colonização (FC%) em folha, caule e raiz em diferentes estádios de desenvolvimento da planta de algodão Bt.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 55   |
| <b>Figura 4.</b> Frequência de colonização (FC%) nos órgãos da planta de algodão, independentemente da transgenia, nas diferentes idades da planta. Barras seguidas de mesma letra, para cada etapa do ciclo de vida da planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 56   |
| <b>Figura 5.</b> Fungos endofíticos isolados de folhas, caules, raízes, flores e sementes de algodoeiros (Bt e não-Bt). <b>A:</b> <i>Acremonium kiliense</i> ; <b>B:</b> <i>Acremonium fusidioides</i> ; <b>C:</b> <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; <b>D:</b> <i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> ; <b>E:</b> <i>Fusarium lateritium</i> ; <b>F:</b> <i>Nigrospora sphaerica</i> ; <b>G:</b> <i>Pestalotiopsis maculans</i> ; <b>H:</b> <i>Guignardia bidwellii</i> ; <b>I:</b> <i>Xylaria</i> sp.; <b>J:</b> <i>Tallaromyces</i> sp.; <b>L:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> ; <b>M:</b> <i>Lecanicillium lecanii</i> ; <b>N:</b> <i>Rhodotorula glutinis</i> ; <b>O:</b> <i>Phomopsis archeri</i> ; <b>P:</b> <i>Phoma eupyrena</i> (Fotos: P. D. S. Vieira)..... | 64   |
| <b>Figura 6.</b> Expressão da proteína Cry1Ac em diferentes órgãos da planta e algodão transgênico (Bt), em função dos estádios de desenvolvimento do vegetal.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 67   |
| <b>Figura 7.</b> Halos de degradação produzidos pela ação de enzimas hidrolíticas extracelulares de fungos endofíticos isolados de algodoeiro (Bt e não-Bt), após 4 dias de incubação a temperatura de 28°C. <b>A:</b> Atividade Lipolítica; <b>B:</b> Atividade Proteolítica; <b>C:</b> Atividade Amilolítica.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 70   |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Pág. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Tabela 1.</b> Plantas de regiões tropicais e subtropicais e o número de gêneros dos fungos endofíticos associados a esses hospedeiros (Adaptado de Azevedo; Araújo, 2007).....                                                                                                                                                                        | 32   |
| <b>Tabela 2.</b> Características químicas do solo utilizado no cultivo dos algodoeiros transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt).....                                                                                                                                                                                                                  | 46   |
| <b>Tabela 3.</b> Total de isolados fúngicos associados aos algodoeiros transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt) e distribuição dos mesmos em cada um dos órgãos (raiz, caule e folha) coletados durante todos os estádios de desenvolvimento da planta de algodão Bt e não-Bt (pré-floração, floração, formação de maçãs e abertura de capulhos)..... | 54   |
| <b>Tabela 4.</b> Frequência de colonização de fungos endofíticos em flores de algodoeiros transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt), coletadas durante a época de floração.....                                                                                                                                                                        | 58   |
| <b>Tabela 5.</b> Frequência de colonização de fungos endofíticos nas sementes antes do plantio e após o plantio dos algodoeiros transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt).....                                                                                                                                                                         | 60   |
| <b>Tabela 6.</b> Índices enzimáticos quanto a atividade proteolítica, lipolítica e amilolítica de fungos endofíticos isolados de raízes, caules, folhas, flores e sementes de algodoeiro transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt), após 4 dias de incubação à temperatura de 28°C em meios específicos para cada enzima.....                          | 69   |

## SUMÁRIO

|                                                                                                       | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                    | 12   |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....                                                                        | 14   |
| 2.1. Algodoeiro ( <i>Gossypium</i> L.): Aspectos Botânicos, Econômicos e Distribuição Geográfica..... | 14   |
| 2.2. Plantas de Algodão Geneticamente modificadas.....                                                | 17   |
| 2.2.1. Algodoeiro Bt (= <i>Bacillus thuringiensis</i> ).....                                          | 17   |
| 2.2.2. Potenciais Efeitos de Plantas Transgênicas sobre Comunidades Microbianas.....                  | 22   |
| 2.3. Fungos Endofíticos.....                                                                          | 25   |
| 2.3.1. Interação Ecológica entre Fungos Endofíticos e Plantas.....                                    | 25   |
| 2.3.2. Diversidade dos Fungos Endofíticos.....                                                        | 30   |
| 2.3.3. Especificidade dos Fungos Endofíticos ao Hospedeiro.....                                       | 37   |
| 2.3.4. Especificidade dos Fungos Endofíticos ao Tecido Vegetal.....                                   | 38   |
| 2.3.5. Influência da Idade do Vegetal sobre Fungos Endofíticos.....                                   | 40   |
| 2.4. Aplicações Biotecnológicas de Enzimas Extracelulares produzidas por Fungos.....                  | 41   |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                           | 46   |
| 3.1. Coleta do Material vegetal.....                                                                  | 46   |
| 3.2. Quantificação da Proteína Cry1Ac.....                                                            | 47   |
| 3.3. Isolamento de Fungos Endofíticos .....                                                           | 48   |
| 3.4. Identificação dos Fungos Endofíticos .....                                                       | 49   |
| 3.5. Caracterização Enzimática dos Fungos Endofíticos.....                                            | 50   |
| 3.6. Análise Estatística.....                                                                         | 51   |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                        | 53   |
| 4.1. Isolamento dos Fungos Endofíticos de Folhas, Caules e Raízes.....                                | 53   |
| 4.2. Isolamento dos Fungos Endofíticos de Flores e Sementes.....                                      | 58   |
| 4.3. Quantificação da Proteína Cry1Ac.....                                                            | 66   |
| 4.4. Caracterização Enzimática dos Fungos Endofíticos.....                                            | 69   |
| 5. CONCLUSÕES.....                                                                                    | 73   |
| 6. REFERÊNCIAS.....                                                                                   | 74   |

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o algodão (*Gossypium* sp.) é uma das culturas mais importantes economicamente, ocupando 856 mil hectares cultivados e uma produção de 1,25 milhões de toneladas na última safra em 2009 (CONAB, 2009).

Desde o início do século XX os programas de melhoramento genético envolvendo o algodoeiro vêm sendo desenvolvidos, com o objetivo principal de aumentar a produtividade. Atualmente, dentre os tipos de algodoeiros geneticamente modificados cultivados no Brasil destacam-se os resistentes a insetos (GUERRANTE, 2003).

O algodoeiro transgênico Bt apresenta inserido em seu genoma o gene da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, que codifica proteínas Cry (=Cristal protéico) tóxicas para insetos lepidópteros pragas (CRICKMORE *et al.*, 1998). E atualmente tem plantio comercial autorizado em diversos países (GUERRANTE, 2003).

O cultivo do algodoeiro Bt tem sido considerado uma tecnologia com inúmeros benefícios, entre eles a redução das aplicações inseticidas, além de ser uma tecnologia de controle de pragas de fácil adoção por ser diretamente veiculada através da semente, não impondo empecilho para utilização por grandes ou pequenos produtores ou com outra prática de cultivo e manejo de pragas (TORRES *et al.* 2009).

As proteínas Cry são expressas nas plantas de forma constitutiva sendo, portanto, produzidas continuamente durante toda a vida da planta, encontrando-se presente no vegetal de forma ativa, sendo acumuladas, principalmente, nos espaços intercelulares, onde podem estabelecer interação direta com microrganismos endofíticos associados (STICHER *et al.*, 1997).

Os fungos endofíticos vivem no interior das plantas pelo menos em um período de seu ciclo de vida (PETRINI, 1991) e ao contrário dos patogênicos, não causam doenças aparentes em seus hospedeiros. Assim, os fungos endofíticos podem promover a sanidade da planta hospedeira, favorecendo o seu potencial adaptativo frente a condições adversas geradas pelo estresse do meio ambiente. É sabido que fungos endofíticos favorecem as plantas quanto ao estresse hídrico, à salinidade, estresses oxidativos, acidez do solo; ou contra o ataque de insetos e microrganismos por meio da

produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos a seus inimigos

Esta relação de simbiose confere maior habilidade competitiva às plantas e permite um pleno desenvolvimento, traduzido por altas taxas de germinação e enraizamento, maior biomassa nos tecidos e maior produção de sementes (SCHARDL; PHILLIPS, 1997; LIU *et al.*, 2001; FAETH, 2002; SCHARDL *et al.*, 2007; SELOSSE *et al.*, 2004; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

O estudo dos fungos endofíticos presentes em vegetais são de extrema relevância por fornecerem informações fundamentais para a avaliação da diversidade e distribuição fúngica global, além de revelar novas taxa, e novas ocorrências para as espécies já existentes (STONE *et al.*, 2004; SIQUEIRA, 2008). Dessa forma, estudos associados à identificação da biodiversidade da microbiota associada a vegetais, representa, além da perspectiva taxonômica, de conhecimento e proteção da biodiversidade, uma grande alternativa para a obtenção de fungos com potenciais diferenciados para investigações científicas e utilização na biotecnologia e indústria.

A expressão da proteína Cry de forma ativa na planta de algodão pode ocasionar efeitos ecológicos adversos (composição ou funções ambientais) na comunidade microbiana associada, como microrganismos do solo, fungos micorrízicos, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos epifíticos e endofíticos (DONEGAN *et al.*, 1995; SAXENA; STOTZKY, 2000; BRUINSMA *et al.*, 2003).

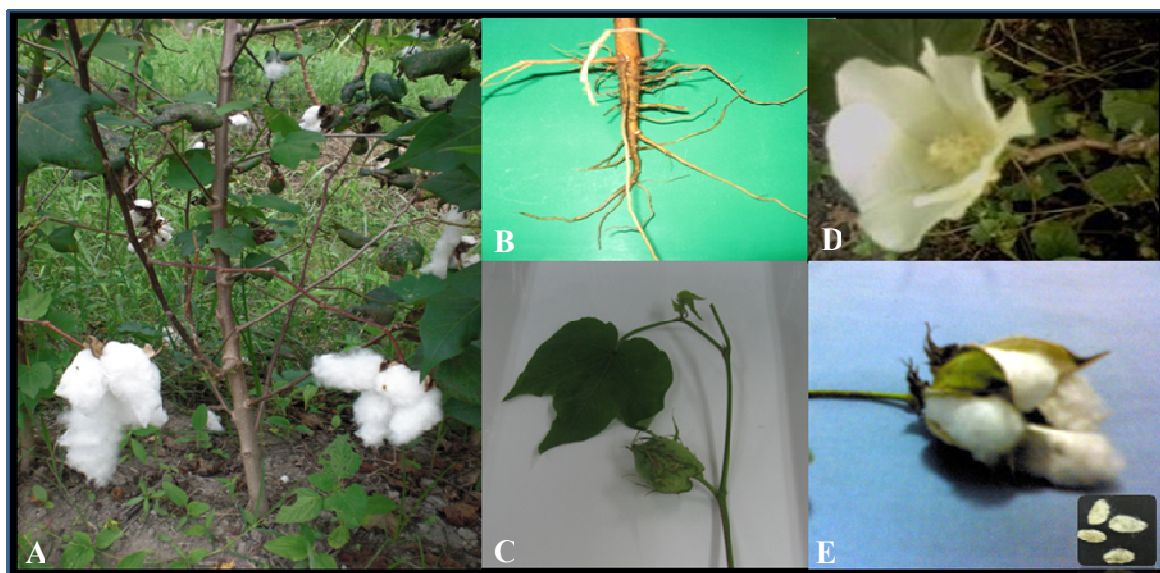
O presente trabalho investigou as possíveis alterações na composição de fungos endofíticos associados ao algodoeiro transgênico (Bt) em comparação ao não-transgênico (não-Bt), em diferentes estádios do desenvolvimento da planta, bem como realizou um levantamento da distribuição desses fungos em diferentes órgãos vegetais e analisou o potencial biotecnológico dos fungos isolados, no que diz respeito à produção de enzimas extracelulares hidrolíticas com valor industrial.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Algodoeiro (*Gossypium* L.): Aspectos Botânicos, Econômicos e Distribuição Geográfica

O algodoeiro é o nome vulgar atribuído a várias espécies do gênero *Gossypium* L., que pertencem a família Malvaceae, ordem Malvales, filo Angiospermae e reino Plantae (ALLARD, 1960; SOUZA; BELTRÃO, 1999).

A morfologia do algodoeiro, assim como sua fisiologia, é extremamente complexa. A raiz principal é do tipo pivotante, como uma continuação direta da haste principal da planta e situa-se em sua grande maioria nos primeiros 20 cm de profundidade no solo, podendo atingir, em condições ideais até 2,5 metros de profundidade; o caule é cilíndrico e ereto, e as folhas são simples, as primeiras surgem após a germinação do algodoeiro, sendo cotiledonares e riniformes, entretanto as folhas verdadeiras são lobadas e incompletas, pois não possuem bainha; a flor é do tipo hermafrodita e simétrica, com vinte ou mais estames iguais soldados pelos filetes, formando um único feixe inserido no receptáculo; o fruto é em forma de cápsula, apresentando de três a cinco lóculos, cada um com seis a oito sementes (Figura 1) (ALLARD, 1960; SOUZA; BELTRÃO, 1999).



**Figura 1.** Morfologia do algodoeiro (*Gossypium* sp.). **A:** Caule cilíndrico; **B:** Raiz pivotante; **C:** Folha lobada; **D:** Flor hermafrodita; **E:** Fruto em cápsula, apresentando lóculos com sementes (Fotos: P. D. S. Vieira).

O algodoeiro apresenta melhor performance quando cultivado em solos férteis e com condições de umidade adequada (sem encharcamento ou estresse hídrico), altas temperaturas (melhor faixa entre 23°C a 32°C) e alta intensidade luminosa na superfície foliar. Em estado selvagem, os arbustos do algodoeiro conseguem atingir até 7 m de altura. Embora o algodão seja conhecido por ter certa resistência à seca, maior que a dos cereais, por exemplo, isso não significa que não necessite de água. Para obtenção de alta produtividade é necessária uma quantidade de água na ordem de 700 mm durante todo o ciclo da cultura previsto entre 140 e 170 dias, conforme a cultivar (GRIMES; EL-ZIK, 1990).

As fases do ciclo de vida da planta do algodão são: estabelecimento ou pré-floração (1-20 dias após a emergência das plântulas), florescimento (21-60 dias após emergência), formação de maçãs (61-100 dias após emergência) e, por fim, maturação dos frutos com a abertura dos capulhos e exposição das fibras de algodão com as sementes (101-170 dias após emergência), sendo cada uma dessas fases de fundamental importância para a alta produtividade da planta (SOUZA; BELTRÃO, 1999).

As primeiras referências históricas do algodão vêm de muitos séculos antes de Cristo. Em escavações arqueológicas nas ruínas de Mohenjo-Daro, no Paquistão foram encontrados vestígios de tela e cordão de algodão (*G. arboreum*) com mais de 5.000 anos. Na América, vestígios do tipo primitivo de *G. barbadense* encontrados no litoral norte do Peru evidenciam que povos milenares daquela região já manipulavam o algodão, há 4.500 anos. Com os Incas, o artesanato têxtil atingiu culminância, pois amostras de tecidos de algodão, por eles deixadas, maracam pela beleza, perfeição e combinação de cores. Foi Alexandre da Macedônia quem introduziu a planta e seus manufaturados no Ocidente e no período da Renascença, a cidade de Veneza representou importante ponto de dispersão dos manufaturados vindos da Índia para a Europa. No Brasil, pouco se sabe sobre a pré-história dessa malvácea, mas desde a época do descobrimento, os indígenas já cultivavam o algodão e convertiam-no em fios e tecidos e o caroço era esmagado, cozido e utilizado no preparo de mingau e o sumo das folhas, utilizado para curar feridas. (PASSOS, 1977).

O algodoeiro é uma das principais plantas domesticadas pelo homem e uma das mais antigas, sendo cultivado comercialmente em mais de 65 países (GRIMES; EL-ZIK, 1990).

De acordo com Fryxell (1992) existem cerca de 50 espécies classificadas e descritas do gênero *Gossypium*, nativas de regiões tropicais e subtropicais, 17 são endêmicas da Austrália, seis do Havaí, e uma (*G. mustelinum* Miers ex Watt) do nordeste brasileiro. As espécies mais utilizadas para fins comerciais são *G. hirsutum* L. também chamado de algodoeiro-das-terras-altas ou algodoeiro-americano (nativo da América Central, das Caraíbas e do sul da Flórida), *G. arboreum* L. ou algodoeiro-arbóreo (nativo da Ásia Meridional), *G. herbaceum* L. ou algodoeiro-asiático ou algodoeiro-do-levante (nativo do sul da África) e *G. barbadense* L. ou algodoeiro egípcio, também designado como algodão-crioulo ou algodão de Sea Island (nativo da América do Sul).

A cultura do algodão atingiu o ápice da importância econômica e social no Nordeste na década de setenta quando foram cultivados 3.247 mil hectares, sendo 2.562,19 mil hectares de algodoeiro arbóreo e 684,91 mil hectares de algodoeiro herbáceo. Naquela época a cultura era responsável pela geração de 1.082.000 empregos no campo. A partir de meados da década de oitenta a cultura entrou em crise, que se prolongou até a safra de 1996/97. As principais causas desta crise foram interferências do governo no mercado interno do algodão, proibindo as exportações e provocando queda dos preços, eliminação de alíquotas de importação da pluma e mudanças na política de crédito rural. Além disso, houve um grande impacto do bicudo nos sistemas de produção dos pequenos produtores, que eram a base de sustentação da economia algodoeira. Como consequência desta crise, em 1997, a área plantada com algodão no Nordeste foi reduzida para 325,57 mil hectares, sendo 29,032 mil hectares de algodoeiros arbóreos e 296,538 mil hectares de algodoeiros herbáceos (FNP, 2006).

Atualmente a cultura do algodão está classificada entre as dez principais culturas agrícolas do Brasil, país que ocupa o quinto lugar na produção mundial de algodão (FNP, 2006), sendo produzido principalmente nos estados do Centro Oeste e Bahia, que embora esteja na região nordeste, possui as condições edafoclimáticas equivalentes ao cerrado do Centro Oeste. No Nordeste, destaca-se a produção por pequenos produtores, que expandiram suas plantações para as áreas de cerrado do sul do Maranhão e Piauí. (FNP, 2006).

Existem no Brasil cerca de 260 espécies de insetos associadas à cultura do algodão, das quais 12 são consideradas pragas importantes, causando grandes prejuízos econômicos.

O uso de produtos químicos para o controle de pragas pode chegar a até 25% do custo da produção. Dentre as pragas da parte aérea do algodão, destacam-se os pulgões (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*) e thrips, que ocorrem na fase inicial do ciclo de vida da cultura. Durante a fase vegetativa e o início da fase reprodutiva do algodão são predominantes os lepidópteros pragas, como o curuquerê (*Alabama argilaceae*) e a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). E na fase reprodutiva são pragas dominantes, o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), a lagarta da maçã (*Helicoverpa virescens* F.) e a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella* Saunders) (FONTES, 2002).

A cultura do algodoeiro também é alvo de doenças causadas por fungos como: murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen), murcha de *Verticillium* (*Verticillium albo-atrum* Rke. Er Berth.), antracnose (*Glomerella gossypii* (South) Ed., que na sua forma imperfeita corresponde à *Colletotrichum gossypii* South) e é uma doença largamente distribuída em todas as regiões úmidas em que se cultiva algodoeiro, constituindo, no Brasil, uma das mais importantes doenças dessa cultura por suas manifestações, prejudicando severamente a germinação e o bom desenvolvimento dos capulhos, fibras e sementes. Além dessas, outras doenças são relatadas provocando manchas em folhas, “damping-off”, podridão de maçãs e capulhos e manchas nas fibras, como a Ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A. S. Costa. Dentre os fungos foliícolas fitopatogênicos de algodão podem ser citados ainda *Ramularia aeola* Atk., *Cerotelium desmum* (Berk, et Br) Arth., *Cercospora gossypina* Cke., *Alternaria tenuis* Nees, *Ascochyta gossypii* Syd., *Botryodiplodia*, *Rhizoctonia*, *Phomopsis*, *Phoma destructiva* Plowr, *Diplodia*, *Monilia* e outros (GALLI *et al.*, 1980).

## 2.2. Plantas de Algodão Geneticamente Modificadas

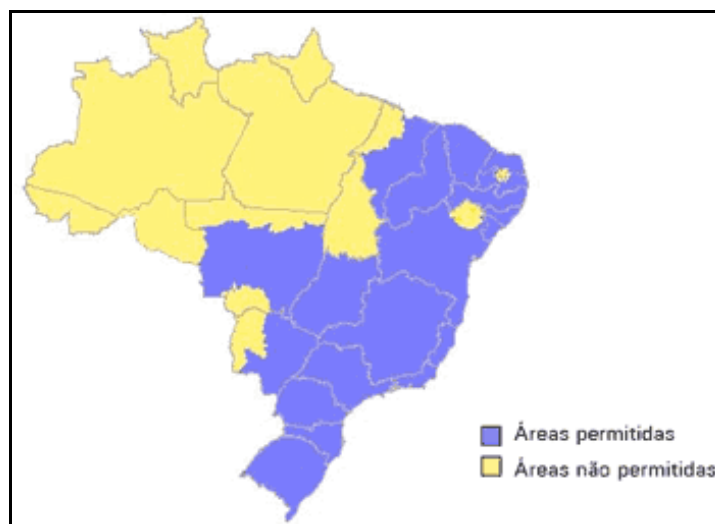
### 2.2.1. Algodoeiro Bt (= *Bacillus thuringiensis*)

Os organismos geneticamente modificados (OGM), também chamados de transgênicos, correspondem a seres vivos cuja estrutura genética foi alterada pela inserção de genes de outro organismo, de modo a atribuir ao receptor, características não programadas pela natureza. O algodão está entre as principais culturas

geneticamente modificadas (GM) comercializadas no mundo (16%), juntamente com a soja (71%) e o milho (31%) (AGROLINK, 2010).

O cultivo de plantas geneticamente modificadas no Brasil se iniciou no fim da década de 1990 de maneira ilegal, gerando muitos conflitos que se estendem à atualidade, mas partir de 1996, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) constituída pela Lei 8.974/95 de Biossegurança, começou a autorizar experimentos com plantas transgênicas, sendo que 60% destes eram de plantas resistentes a herbicidas e 40% tolerantes a insetos (GUERRANTE, 2003).

Variedades de algodoeiro geneticamente modificado para resistência a insetos têm sido avaliadas em campo no Brasil desde 1998 e em março de 2005, o algodão transgênico Bt (*B. thuringiensis*) Bollgard®, desenvolvido pela transnacional Monsanto, resistente a lepidópteros, foi liberado para plantio e comercialização no país, sob a imposição de determinadas condições como a apresentação de métodos para identificar este tipo de algodão e o zoneamento que define onde pode ser plantado tal organismo, sendo proibido pelo Ministério da Agricultura o plantio do algodão transgênico em alguns estados do país, como toda a região Norte e parte dos estados do Maranhão, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba e Rio Grande do Norte (FONTES, 2002; HILBECK *et al.*, 2006) (Figura 2).



**Figura 2.** Localização das zonas de exclusão para o plantio de cultivares de algodoeiro geneticamente modificado. Fonte: Embrapa Algodão.

Essas medidas são necessárias para evitar possíveis fatores de risco como o fluxo gênico, por polinização cruzada para espécies compatíveis com o consequente aumento de plantas invasoras. Existe ainda a possibilidade de transferência não intencional de informações genéticas entre organismos, de forma que microrganismos originalmente não patogênicos podem vir a se tornar pragas ou ter sua amplitude de hospedeiros aumentada (DALE, 1992; WILLIAMSON, 1992; MEADOWS, 1993).

O algodão GM Bt liberado no Brasil é resistente a insetos da ordem Lepidóptera pragas do algodoeiro que ocorrem no país, como o curuquerê (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), uma vez que essas plantas-Bt apresentam inserido no seu genoma o gene Cry1Ac da bactéria *B. thuringiensis*, responsável por codificar a endotoxina ou proteína cristal, permitindo a expressão contínua dessas proteínas em todos os tecidos da planta. Dessa forma, as lagartas recém-eclodidas ao se alimentarem com tecidos das plantas algodão das cultivares Bt, ingerem a proteína Cry1Ac que causa lise celular e morte do inseto, determinando o controle da praga antes que ela cause prejuízos à lavoura com a vantagem de que apenas os insetos alvo são controlados (ZHAO *et al.*, 2001; BORÉM, 2004).

A bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* que é a fonte do gene de resistência a insetos nas plantas de algodão Bt, é uma bactéria aeróbia facultativa, móvel, Gram-positiva, utilizada no controle biológico, e durante a fase de esporulação forma uma inclusão cristalina constituída por polipeptídeos denominados de endotoxinas ou proteína cristal (Cry) (HANNAY; FITZ-JAMES, 1955; SCHNEPF *et al.*, 1998), e as libera no meio ambiente no final da esporulação. Esse cristal protéico apresenta ação tóxica (centenas a milhares de vezes mais potentes que agrotóxicos) e específica para larvas de diversas ordens de insetos (VALADARES-INGLIS *et al.*, 1998).

A proteína cristal, quando sintetizada, apresenta-se na forma não-patogênica (inativa) e é denominada de pró-toxina. Na autólise da bactéria, os cristais de proteína são liberados. Para torná-la tóxica é necessário ativá-la. Isso ocorre quando a larva de um inseto susceptível ingere o cristal, que necessita passar por sete etapas de clivagem, no percurso esofágico, sendo solubilizado no intestino médio do inseto (pH alcalino), pela clivagem realizada por proteases, originando peptídeos resistentes às proteases que

são capazes de se ligar aos receptores das microvilosidades das células colunares do intestino médio. Essa inserção leva à formação de poros nas membranas apicais das microvilosidades e subsequente lise e ruptura do epitélio do intestino médio, o qual libera seu conteúdo celular (SAXENA; STOTZKY, 2000; BRAVO *et al.*, 2007).

As proteases que cada grupo de inseto possui são responsáveis pelos diferentes níveis de toxicidade de cada cepa nos diversos insetos (LIGHTWOOD *et al.*, 2000; BRAVO *et al.*, 2004).

Os genes *cry* estão localizados em *B. thuringiensis* em plasmídios e muitos isolados possuem diversos genes *cry* responsáveis pela síntese de diferentes proteínas inseticidas (LERECLUS *et al.*, 1993) e de acordo com sua estrutura molecular, bem como seu alcance de hospedeiros, esses genes podem ser classificados de *cry1* a *cry55* (HÖFTE; WHITELEY, 1989; CRICKMORE, 2006).

No entanto, ao contrário do que ocorre com a bactéria *B. thuringiensis* e em formulações, onde a proteína Cry encontra-se na forma inativa de pró-toxina, deve-se considerar que no caso da planta de algodão Bt, a toxina Cry encontra-se na forma ativa. As plantas Bt produzem uma forma truncada de proteínas Cry, a qual se assemelha àqueles peptídeos tóxicos ativados após sua clivagem no intestino dos insetos susceptíveis (CRICKMORE, 2006). Essas proteínas são acumuladas, principalmente, nos espaços intercelulares, onde teriam uma ação direta sobre os microrganismos associados (STICHER *et al.*, 1997).

A estabilidade da proteína cristal é altamente variável, desde poucos dias à vários meses dependendo das condições ambientais, porém os mecanismos da degradação da proteína Cry foram pouco estudados (PEFERÖEN, 1992; FERREIRA *et al.*, 2003; SAXENA; STOTZKY, 2000). Sabe-se, no entanto que durante a excreção de proteínas Bt pelas raízes de plantas geneticamente modificadas, cultivadas em solos argilosos, podem ser formadas bolhas de proteína Cry com a argila, conservando um efeito inseticida por muito mais tempo nesse tipo de solo (SAXENA; STOTZKY, 2001; PALM, 2002; CONNER, 2003).

Pesquisadores da Universidade de Nova York (EUA) e da Universidade de Caracas (Venezuela), em 1999, mostraram que a toxina secretada pelo milho Bt é eliminada pelas raízes da planta, fixando-se durante pelo menos 234 dias no solo e

permanece biologicamente ativa, conservando sua função inseticida durante 25 dias (SAXENA; STOTZKY, 2001; BAUMGARTE; TEBBE, 2005).

O algodão transgênico Bt ocupa o segundo lugar em áreas plantadas no mundo, representando aproximadamente 7% da área cultivada com transgênicos. Atualmente tem plantio comercial autorizado na África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, China, Colômbia, Estados Unidos, Índia, Indonésia e México, dentre outros países (HILBECK *et al.*, 2006).

Em pesquisa realizada pelo *United States National Research Council* em 2000 foi verificada a queda de cerca de 1 milhão de quilogramas na quantidade de inseticidas aplicados nas lavouras de algodão Bt para controlar os insetos-pragas. A adoção do algodão Bt na China reduziu drasticamente o número de contaminações com inseticidas entre os agricultores, e na Austrália e Estados Unidos, foi documentado um efeito positivo no número e diversidade de insetos nos campos de algodão Bt (CARPENTER *et al.*, 2002).

Betz *et al.* (2000) relataram aumento na produção de algumas culturas onde se utilizaram plantas Bt. No cultivo do algodão Bt (Cry1Ac), houve uma eficácia de 70 a 99% para insetos alvos, aumentando assim o controle dessas pragas. Quando comparado o rendimento de uma produção convencional e uma geneticamente modificada foi observado um aumento em torno de 30% para o algodão Bt.

Com relação ao impacto ambiental de culturas Bt, Betz *et al.* (2000), acreditam que a quantidade exposta da proteína Cry em plantas seria menor que a quantidade aplicada pelos produtos à base de Bt e segundo os autores, animais não alvos, quando expostos à alta quantidade de toxina, mostram-se não susceptíveis.

Por outro lado, pode-se amplamente identificar os principais riscos dos cultivos de Plantas Geneticamente Modificadas sobre a saúde e o meio ambiente, diretamente ligados à instabilidade dos genomas dos seres vivos e à imensa complexidade das vias metabólicas dos vegetais. Acrescenta-se a essas incertezas científicas, uma fraca avaliação toxicológica alergênica das proteínas secretadas pelas Plantas Geneticamente Modificadas. Nesse contexto, estudos, *in vitro*, revelam que proteínas Cry podem danificar as células intestinais de mamíferos e deteriorar os glóbulos vermelhos humanos (RANI; BALARAMAN, 1996; FARES; EL-SAYED, 1998; VAZQUEZ *et al.*, 1999).

Séralini *et al.* (2007) basearam-se em dados fornecidos pela Monsanto, e acrescentaram ferramentas apropriadas de análise estatística para comparar os parâmetros bioquímicos dos ratos que comeram milho Bt MON863 com os que comeram o equivalente não-transgênico, e as conclusões indicaram que o consumo de milho Bt MON863 acarretaram uma leve variação no crescimento dos ratos, proporcional à quantidade consumida de milho geneticamente modificado.

Os efeitos das endotoxinas Bt nos organismos não-visados não é totalmente conhecido, e embora alguns estudos apontem que essa proteína não interfere na diversidade de insetos não-alvo associados ao algodoeiro geneticamente modificado em comparação com o convencional (VALADARES-INGLIS *et al.*, 1998; TORRES; RUBERSON, 2008), não se deve excluir o fato de que sua toxicidade aos insetos benéficos pode acontecer e provocar uma forte perturbação ecológica. A toxicidade dessas proteínas em insetos não-alvo foi comprovada em larvas de borboletas Monarca e em *Chrysoperla cárnea* (JOHNSON *et al.*, 1995; LOSEY *et al.*, 1999; DARVAS, 2003; DIVELEY *et al.*, 2004).

A proteína Bt pode ser encontrada em organismos herbívoros não-alvo presentes nos campos de cultivo, assim como em artrópodes predadores desses herbívoros (coleópteros, aracnídeos, etc). Desse modo, as culturas de plantas geneticamente modificadas Bt podem conduzir a uma perturbação dos agrossistemas com forte impacto sobre comunidades animais. Segundo os autores, a exposição a longo prazo à proteína Bt é, portanto, demonstrada, e esses dados deveriam ser levados em conta na avaliação das culturas transgênicas ( KINDERLERER, 2001; OBRYCKI *et al.*, 2005).

### **2.2.2. Potenciais Efeitos de Plantas Transgênicas sobre Comunidades Microbianas**

Embora alguns trabalhos tenham sido realizados na busca de estabelecer uma correlação entre plantas geneticamente modificadas (PGMs) e seus efeitos sobre comunidades microbianas, a grande maioria destes foi desenvolvido em ambientes temperados. PGMs apresentam metabolismo diferenciado em relação à planta não modificada, produzindo exsudados diversificados, implicando em um novo equilíbrio na comunidade microbiana associada (DONEGAN *et al.*, 1995; SCALLA, 2000).

Por isso, transformações genéticas, como a inserção do gene *cry* de *B. thuringiensis* no genoma de plantas, podem provocar efeitos benéficos ou maléficos na composição e função ecológica da microbiota do solo, bem como da comunidade de fungos epifíticos, endofíticos e patogênicos associados, por causa da introdução da toxina ativa nos resíduos da cultura, exsudados da raiz e inclusive pólen (DONEGAN *et al.*, 1995; SAXENA; STOTZKY, 2000).

Alguns estudos constataram os efeitos da transgenia sobre as comunidades microbianas associadas às plantas transgênicas. Donegan *et al.* (1995) observaram que dois híbridos de algodão, que expressam a endotoxina de *B. thuringiensis*, causaram aumento nos níveis de bactérias totais e populações fúngicas da rizosfera em relação aos outros tratamentos sendo também detectadas mudanças na composição da comunidade bacteriana.

Dessaux (1998) também verificou a modificação da flora microbiana do solo como consequência da secreção considerável e permanente de proteínas Cry pelas raízes da planta.

Munkvold *et al.* (1999) realizaram avaliações comparativas entre diferentes produtos comerciais de milho Bt e seus respectivos isogênicos, evidenciando que a utilização de milho Bt em comparação com o milho não transformado reduziu a incidência do fungo fitopatogênico *Fusarium*, bem como as quantidades de micotoxinas produzidas por esse fungo.

Dunfield *et al.* (2001) observaram que a diversidade funcional e a composição da comunidade microbiana da rizosfera de uma variedade transgênica de canola (*Brassica napus*) tolerante a herbicida, foram diferentes da variedade convencional.

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

Os efeitos da transgenia foram também detectados em fungos micorrízicos arbusculares, um grupo de fungos fundamental para a fertilidade do solo e nutrição das plantas (TURRINI *et al.*, 2004; CASTALDINI *et al.*, 2005). Exsudatos das raízes de

plantas de milho Bt 176, expressando o gene Cry1Ab para a produção da toxina Bt, afetaram o desenvolvimento regular dos apressórios de *Glomus mosseae* (TURRINI *et al.*, 2004). O milho Bt 176 e seus resíduos utilizados como fertilizantes afetaram também a comunidade de bactérias da rizosfera, a respiração no solo e o estabelecimento de associações com fungos micorrízicos do próprio ambiente (CASTALDINI *et al.*, 2005).

Em 2006, Götz *et al.* demonstraram que variedades de batata transgênica expressando lisozima T4 afetaram consideravelmente a comunidade de fungos e bactérias endofíticas associados às raízes.

No cultivo de mamão resistente a vírus, foram observados aumentos significativos no número de fungos, bactérias e actinomicetos do solo, em relação ao solo de mamão convencional (WEI *et al.*, 2006).

A Equipe do Instituto Nacional de Saúde Pública e Meio Ambiente da Holanda estabeleceu um elo entre a presença de resíduos de milho Bt e impactos sobre a comunidade microbiana do solo. Os pesquisadores estudaram as diferenças de influência sobre a respiração microbiana dos solos em três situações: solos cobertos de resíduos de cultura de milho transgênico contendo a proteína Cry1Ab, solos recobertos de cultura de milho convencional e solos sem resíduo de culturas e os resultados mostraram que a proteína Cry1Ab influencia a composição microbiana do solo (MULDER *et al.*, 2006).

Em estudo de campo, Baumgarte e Tebbe (2005) verificaram que a estrutura da comunidade bacteriana na rizosfera do milho-Bt MON810 foi menos afetada pela presença da proteína Cry1Ab do que por outros fatores ambientais, contudo enfatizaram a importância de se considerar os efeitos da proteína Cry1Ab sobre organismos não-alvo após a colheita, pois a toxina pode ser detectada até sete meses após a colheita, em resíduos de folhas e principalmente de raízes.

Em outros estudos, porém, não foram observados efeito da transgenese nas comunidades microbianas. Em 2001, Saxena e Stotzky concluíram que a proteína Cry1Ab presente nos exsudados e biomassa de milho Bt, não provocou variações na quantidade de nematóides, protozoários, bactérias e fungos e ainda que presente no intestino de minhocas, não produziu nenhum efeito para este organismo.

Lewis *et al.* (2001) avaliaram o efeito de plantas de milho Bt sobre a colonização do fungo endofítico entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Os resultados

demonstraram não haver diferenças significativas nos níveis de endofitismo entre plantas transgênicas e convencionais.

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

Em 2004, Devare *et al.* avaliando a comunidade bacteriana de plantas de milho Bt (gene cry3Bb), verificaram que a mesma também não apresentou alterações significativas em relação à variedade isogênica não-Bt.

Vyllany *et al.* (2004) não encontraram diferença no número de bactérias e fungos presentes na rizosfera de milho Bt e não-Bt, sendo registrados altos níveis de atividade microbiana na rizosfera de milho geneticamente modificado pelo gene cry1Ab (milho Bt), quando comparada à rizosfera do milho isogênico não-Bt.

Knox *et al.* (2006) compararam o desenvolvimento de micorrizas em cultivares comerciais de algodão expressando genes de resistência a insetos (Cry1Ac e Cry2Ab) e suas isolinhas, observando que o algodão geneticamente modificado não apresenta efeito sobre a colonização de fungos micorrízicos arbusculares de raízes.

## **2.3. Fungos Endofíticos**

### **2.3.1. Interação Ecológica entre Fungos Endofíticos e Plantas**

As plantas estabelecem associações com diferentes microrganismos como fungos e bactérias, dentre estes destacam-se bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos e microrganismos endofíticos. Durante os últimos 30 anos o termo endofítico, que vem do grego (*éndon*= dentro + *phytón*= planta) tem sido utilizado na literatura micológica para descrever a micobiota que vive internamente nas plantas. Conforme citado por Azevedo (2000) foi De Barry, em 1866, quem primeiro usou este termo ao se referir a fungos que vivem dentro dos tecidos vegetais, delineando uma possível distinção entre os fungos endofíticos e os patógenos de plantas.

Carroll em 1986 restringiu o uso do termo endofítico a organismos endossimbiontes que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, excluindo as micorrizas e os fungos patogênicos.

Petrini (1991) propôs a expansão da definição de Carroll, incluindo todos os microrganismos que, em algum período do seu ciclo de vida, colonizam tecidos internos da planta, sem causar dano aparente ao seu hospedeiro. Esta definição pode ser aplicada não somente aos simbiossiontes, mutualistas ou neutros, mas também a patógenos latentes, inativos e emergentes (PETRINI, 1991; AZEVEDO, 1998; SELOSSE *et al.*, 2004). E finalmente, a definição mais atual afirma que os endofíticos são microrganismos que podem ou não crescer em meios de cultura e que colonizam o interior de tecidos e órgãos vegetais, de forma assintomática inaparente, sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; HYDE; SOYTONG, 2008).

A interação planta-endofítico na natureza vem sendo questionada principalmente quando se trata do equilíbrio antagônico e a relação simbiótica entre os dois (FAETH, 2002; SELOSSE *et al.*, 2004; SAIKKONEN *et al.*, 2004; SCHULTZ; BOYLE, 2005; KOGEL *et al.*, 2006).

Não existe uma exata distinção entre as categorias de microrganismos epifíticos, endofíticos e patogênicos, havendo sim, um gradiente com interfaces entre endofíticos, epifíticos e patógenos, onde um microrganismo epifítico pode ser eventualmente encontrado dentro de um vegetal; um endofítico, por sua vez, em certas condições, pode tornar-se um patógeno; e um patógeno, em determinadas condições, não afeta o hospedeiro e pode ser considerado um endofítico (AZEVEDO, 1998; PEIXOTO-NETO *et al.*, 2002; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Mas o fato é que os fungos endofíticos, ao contrário dos patogênicos, não causam doenças aparentes em seus hospedeiros e desempenham as mais diversas relações ecológicas, podendo ser considerados neutros, quando não apresentam nenhum efeito detectável em seus hospedeiros, bem como podem ser simbiossiontes mutualistas, comensalistas, patógenos latentes e/ou saprofíticos (BACON; WHITE, 2000; SCHULTZ; BOYLE, 2005; KOGEL *et al.*, 2006).

Os mecanismos de colonização dos tecidos vegetais por fungos endofíticos, ocorrem por: penetração de esporos por fissuras ou aberturas naturais, transmissão por sementes e inoculação dos esporos por insetos diretamente nas plantas.

No primeiro mecanismo, também conhecido como transmissão horizontal, o fungo se dispersa de um vegetal para outro mediante esporos e esse tipo de transmissão ocorre na maioria dos casos em plantas lenhosas. Nesse caso, os fungos podem colonizar o hospedeiro através da zona radicular ou os esporos aerotransportados podem penetrar no vegetal por aberturas artificiais como fissuras sofridas pela ação de pragas, animais e agressões abióticas ou por aberturas naturais como estômatos e hidatódios presentes nas partes aéreas da planta como folhas, caule, cotilédones, flores e frutos. Enquanto que na transmissão vertical, que tem sido amplamente estudada em gramíneas, os fungos são transmitidos entre gerações através das sementes, contendo fungos, da planta hospedeira (PETRINI, 1991; SAIKKONEN *et al.*, 2004; MARINHO *et al.*, 2005; JOHRI, 2006).

As faces vasculares e os espaços entre as células são o principal nicho destes fungos. Dentro da planta os endofíticos podem permanecer próximos ao local de entrada ou disseminar pelo sistema vascular alojando-se intra e/ou intercelularmente (BACON; WHITE, 2000). Os nutrientes que compõem a seiva lhes brindam com o alimento necessário para seu desenvolvimento, sendo os endofíticos, portanto, fungos sistêmicos (STROBEL, 2003; SAIKKONEN *et al.*, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Existe uma íntima relação evolutiva entre fungos endofíticos e plantas, e essa relação, provavelmente, foi iniciada a cerca de 100 milhões de anos com o surgimento das primeiras plantas na Terra (STROBEL, 2003).

Durante a evolução das plantas, os fungos endofíticos ocorreram e promoveram grande potencial adaptativo às espécies vegetais hospedeiras frente a condições adversas geradas pelo estresse, seja ele do tipo abiótico, como a seca, salinidade, estresses oxidativos, solos ácidos com alto teor de Zn e Al entre outros; ou biótico como o ataque de insetos, microrganismos e animais herbívoros, por meio da produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos aos seus inimigos. Esta simbiose confere maior habilidade competitiva às plantas e permite um pleno desenvolvimento, traduzido por altas taxas de germinação e enraizamento, maior biomassa nos tecidos e maior produção de sementes (SCHARDL; PHILLIPS, 1997; LIU *et al.*, 2001).

Os fungos endofíticos habitam mais frequentemente o interior dos tecidos aéreos de seus hospedeiros, desempenhando várias e estreitas relações ecológicas, como o

mutualismo (HALLMANN *et al.*, 1997; SAIKKONEN *et al.*, 1998; SELOSSE *et al.*, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Diversos fungos endofíticos têm sido descritos como sendo importantes para a proteção do hospedeiro contra insetos, é o caso de *Acremonium lolii*, *Balansia cyper*, *Cladosporium sphaerosperum*, *Muscudor vitigenus* e *Phomopsis oblonga*, que produzem substâncias que atuam como um repelente de insetos. Enquanto que, outros fungos como *Beauveria bassiana* e *Dimorphum lecanii* são conhecidos como entomopatogênicos, sendo bastante utilizados no controle biológico de insetos pragas na agricultura e são também encontrados como endofíticos, protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos. (AZEVEDO *et al.*, 2000; LEWIS *et al.*, 2000; GÓMEZ-VIDAL *et al.*, 2009).

Atribuem-se outras características importantes aos endofíticos como produção de compostos de interesse biotecnológico (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2000; STROBEL, 2003), bem como a promoção do crescimento vegetal, como os fungos *Trichoderma* em feijão e *Piriformospora indica* em tomateiros. Isto se deve, principalmente, a produção de fitormônios (TAN; ZOU, 2001; BANDARA *et al.*, 2006).

Alguns autores sugerem que certos fungos endofíticos produzem compostos igualmente presentes em suas plantas hospedeiras, como algumas enzimas (celulases e ligninases) em *Xylaria* sp., fatores de crescimento como a giberelina em *Fusarium moniliforme* (STROBEL, 2003).

Os fungos endofíticos também são excelentes produtores de metabólitos secundários com atividade biológica, os quais desempenham papel fundamental na sustentabilidade dos ecossistemas e na biodiversidade (GUNATILAKA, 2006). É graças a sua amplitude metabólica e enzimática, que eles são encontrados colonizando várias plantas vasculares e em diferentes habitats, onde alguns desses metabólitos ajudam a planta hospedeira a sobreviver às condições ambientais e outros ajudam a combater e mesmo prevenir infecções por patógenos (LI *et al.*, 2000; LI; STROBEL, 2001; ZOU *et al.*, 2000; STROBEL, 2003; ARNOLD *et al.*, 2000), anti-helmínticos, anti-herbívoros e inseticidas (AZEVEDO *et al.*, 2000; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; FIRAKOVA *et al.*, 2007), apresentando grande potencial que pode ser explorado na agricultura (ZOU *et al.*, 2000).

O fungo endofítico de gramíneas *Neotyphodium* sp. atua como agente anti-herbivoria, apresentando metabólitos ativos como a ergopeptina e ergovalina, que agem

no sistema nervoso central elevando a temperatura corpórea, provocando vasoconstrição e reduzindo os níveis de prolactina nos animais. As neurotoxinas Lolitrem A e B causam a dificuldade na movimentação dos animais que se alimentam da gramínea. A peramina, pirrolizidina e a pirrolopirazina atuam como um inseticida, tornando a planta menos atrativa para os insetos. *Neotyphodium* aumentou a tolerância à seca para seu hospedeiro *Festuca aerundinacea*, o crescimento da raiz, a produção de sementes, germinação, captação de fósforo e resistência a nematóides e insetos (SAIKKONEN *et al.*, 1998; PANACCIONE *et al.*, 2001).

Os metabólitos bioativos de microrganismos endofíticos têm mostrado capacidade de inibir ou matar uma ampla variedade de agentes patogênicos incluindo fitopatógenos, fungos, bactérias e vírus (STROBEL *et al.*, 1999; GUO *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2000; STROBEL *et al.*, 2004; GUNATILAKA, 2006), além de apresentarem ação antibacteriana, antifúngica e antitumoral (WAGENAAR *et al.*, 2000; STROBEL *et al.*, 2004) e atuarem como agentes antidiabéticos e imunossupressivos (ZHANG *et al.*, 1999), sugerindo sua importância para a indústria farmacêutica (STROBEL; DAISY, 2003),

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

*Muscodor albus*, uma nova espécie de fungo endofítico isolado da planta de canela (*Cinnamomum zeilanicum*), demonstrou ser capaz de inibir e matar outros fungos e bactérias pela produção de cinco tipos diferentes de compostos metabólitos voláteis (STROBEL, 2003).

Na Tailândia, Wiyakrutta *et al.* (2004), isolaram fungos endofíticos de plantas medicinais capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, anticancerígena e antimalárica.

Yandry *et al.* (2006) observaram a atividade antagônica dos fungos endofíticos de plantas medicinais do Equador frente a várias bactérias patogênicas. E, ainda, outros autores ressaltam o grande potencial dos fungos endofíticos na síntese de metabólitos bioativos (PHONGPAICHIT *et al.*, 2006; KUMALA *et al.*, 2006).

De acordo com Li *et al.* (2008) do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *Hibiscus tiliaceus* foram obtidos terpenos que desempenham papel importante na proteção da planta hospedeira contra as infecções microbianas.

O acetato de etila obtido do extrato do fungo endofítico *Botryosphaeria rhodina* apresentou atividade antifúngica, assim como potentes efeitos citotóxicos e antiproliferativa contra várias linhagens de células cancerosas (ABDOU *et al.*, 2009). Enquanto que de isolados de *Chaetomium* obtidos das plantas medicinais Gingo biloba e *Othanthus maritimus* foram extraídas novas substâncias como esteróides e um novo tetrahydrofurano, respectivamente (QIN *et al.*, 2009).

Além dos aspectos adaptativos dos fungos endofíticos, seu estudo é indispensável para a mitigação dos danos antrópicos ao meio ambiente. Outras aplicações seriam a manipulação e introdução de genes exógenos de interesse em plantas hospedeiras (VILA-AIUB *et al.*, 2003), indicação de deficiências nutricionais de plantas (OTERO *et al.*, 2002), além de contribuir como fonte de diversidade e variabilidade para os outros fungos (GAMBOA; BAYAN, 2001).

### 2.3.2. Diversidade dos Fungos Endofíticos

No planeta Terra, especialmente nas florestas tropicais e temperadas, existem aproximadamente 400.000 espécies de plantas, onde cada uma delas pode abrigar pelo menos entre 3 a 6 espécies de endofíticos. Dessa forma, o número total desses microrganismos ao nível mundial compreende aproximadamente 1 milhão de espécies fúngicas com tal comportamento (STROBEL *et al.*, 2004).

No entanto, as estimativas dos números de espécies de fungos endofíticos, em sua maioria, são baseadas em regiões de clima temperado e nas frequências de colonização observadas para espécies que produzem estruturas sexuais bem aparentes, ocasionando, com isso, duas falhas de amostragem neste tipo de estimativa, uma referente às regiões tropicais e outra aos fungos endofíticos não-esporulantes, ambos pouco explorados (GAMBOA *et al.*, 2002; ARNOLD *et al.*, 2000).

Considerando-se a presença de fungos endofíticos e a alta diversidade associada aos climas tropicais, a proporção sugerida para o número total de espécies de fungos seria de 33 espécies fúngicas para cada espécie vegetal, compreendendo aproximadamente 8.250.000 espécies (ARNOLD *et al.*, 2000; HAWKSWORTH, 2000; GAMBOA *et al.*, 2002)..

Os fungos endofíticos são encontrados em todas as plantas estudadas até o presente: algas, briófitas, pteridófitas, coníferas, arbustos e árvores em geral (PETRINI *et al.*, 1981; Hawksworth, 1998; LEGAULT *et al.*, 1989; SCHULZ *et al.*, 1993; MELNROY; KLOPPER, 1995; FISHER, 1996; FAETH; HAMMON, 1997; HUANG *et al.*, 2001; STROBEL *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2003; TAECHOWISAN *et al.*, 2003; KUMAR; HYLE, 2004; GONTHIER *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; RUNGJINDAMAI *et al.*, 2008; SÁNCHEZ MÁRQUEZ *et al.*, 2008; TAO *et al.*, 2008).

Os estudos revelam que a micobiota endofítica presente em vegetais de regiões de clima temperado é bastante diversa das espécies encontradas em associação com plantas de regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (STROBEL, 2004; SAMUELS, 2004; SOUZA *et al.*, 2004). A heterogeneidade espacial das florestas tropicais é um aspecto que pode ser determinante na estruturação das comunidades endofíticas. As florestas tropicais apresentam uma maior complexidade estrutural que outros ecossistemas, originando abundantes gradientes, microclimas e microhabitats tanto horizontal como verticalmente. E esta complexa arquitetura da floresta pode ser um fator importante para determinar a abundância desses microrganismos (RODRIGUES; PETRINI, 1997). Não obstante, a conservação de microrganismos endofíticos está diretamente relacionada à conservação de espécies vegetais, especialmente às presentes em florestas tropicais (STROBEL; DAISY, 2003).

Diversos fungos endofíticos já foram registrados em plantas de regiões tropicais e subtropicais (Tabela 1), mas ainda existem muitas espécies encontradas em associação com vegetais tropicais e que ainda não foram descritas (FISHER *et al.*, 1996; RODRIGUES, 1994; ARNOLD *et al.*, 2000; RODRIGUES; SAMUELS, 1990; WHITE, 1993; FISHER; PETRINI, 1992).

**Tabela 1.** Plantas de regiões tropicais e subtropicais e o número de gêneros dos fungos endofíticos associados a esses hospedeiros (Adaptado de Azevedo; Araújo, 2007).

| Planta hospedeira                                                                                                                                          | Nº de Gêneros | Referência                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Anacardium occidentale</i> (Brasil)                                                                                                                     | 22            | Medeiros (1988), Oliveira (1999), Frire & Bezerra (2001)                                                                                            |
| <i>Arachis</i> (Índia)                                                                                                                                     | 18            | Suryanayanan & Murali (2006)                                                                                                                        |
| <i>Azadirachta indica</i> (Índia)                                                                                                                          | 1             | Rajagopal & Suryanarayanan (2000)                                                                                                                   |
| <i>Bactris gasipae</i> (Brasil)                                                                                                                            | 10            | Costa-Neto (2002), Almeida <i>et al.</i> (2005)                                                                                                     |
| <i>Cecropia sciadophylla</i> , <i>C. ficifolia</i> (Brasil)                                                                                                | 5             | Cruz (2004)                                                                                                                                         |
| <i>Citrus</i> spp. (Brasil, Argentina, Hong-Kong)                                                                                                          | 38            | Wright <i>et al.</i> (1998), Gai <i>et al.</i> (2000), Araújo <i>et al.</i> (2001), Glienke-Blanco <i>et al.</i> (2002), Duran <i>et al.</i> (2005) |
| <i>Cocos nucifera</i> (Índia)                                                                                                                              | 37            | Grivasan (2004)                                                                                                                                     |
| <i>Coffea arabica</i> (Porto Rico)                                                                                                                         | 6             | Santamaría & Bayman (2005)                                                                                                                          |
| <i>Copaifera multijuga</i> (Brasil)                                                                                                                        | 2             | Cassa-Barbosa (2001)                                                                                                                                |
| <i>Copernicia prunifera</i> (Brasil)                                                                                                                       | 15            | Freira & Bezerra (2001)                                                                                                                             |
| <i>Cuscuta reflexa</i> (Índia)                                                                                                                             | 28            | Suryanarayanan <i>et al.</i> (2000)                                                                                                                 |
| <i>Ficus benghalensis</i> (Índia)                                                                                                                          | 16            | Suryanarayanan & Vijaykrishna (2001)                                                                                                                |
| Espécies florestais (Índia, Guiana, Porto Rico)                                                                                                            | 26            | Gamboa & Bayman (2001), Suryanarayanan <i>et al.</i> (2002), Cannon & Simmons (2002), Lu <i>et al.</i> (2004)                                       |
| <i>Glycine Max</i> (Brasil)                                                                                                                                | 18            | Mendes <i>et al.</i> (2001), Pimentel <i>et al.</i> (2006)                                                                                          |
| Gramíneas e plantas daninhas: <i>Brachiaria</i> , <i>Digitaria</i> , <i>Paspalum</i> , <i>Parthenium</i> e <i>Rhinchelitrum</i> (Brasil, Colômbia, México) | 9             | Alquati (1999), Bagagli <i>et al.</i> (1995), Kelemu <i>et al.</i> (2001), Romero <i>et al.</i> (2001), Huang & Kelemu (2004)                       |
| Halófitas e plantas do mangue: <i>Rhizophora apiculata</i> e <i>R. mucronata</i> (Índia)                                                                   | 20            | Suryanarayanan <i>et al.</i> (1998), Suryanarayanan & Kumaresan (2000), Kumaresan & Suryanarayanan (2002)                                           |
| <i>Ilex paraguariensis</i> (Brasil)                                                                                                                        | 17            | Penna (2000), Takeda <i>et al.</i> (2003)                                                                                                           |
| <i>Mangifera indica</i> (Brasil)                                                                                                                           | 20            | Freire & Bezerra (2001), Carvalho <i>et al.</i> (2005)                                                                                              |
| <i>Manilkara bidentata</i> (Porto Rico)                                                                                                                    | 16            | Lodge <i>et al.</i> (1996)                                                                                                                          |
| <i>Musa</i> (Brasil, China, Tailândia)                                                                                                                     | 30            | Pereira <i>et al.</i> (1999), Photita <i>et al.</i> (2001), Cao <i>et al.</i> (2003)                                                                |
| Orquídeas ( <i>Lepanthes</i> ) (Porto Rico)                                                                                                                | 12            | Bayman <i>et al.</i> (1997), Bayman <i>et al.</i> (2002), Otero <i>et al.</i> (2002)                                                                |

|                                                                                                                                                        |    |                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Palmeiras: <i>Euterpe oleracea</i> , <i>Livistona chinensis</i> , <i>Sabal bermudana</i> e <i>Licuala</i> (Brasil, Índia, Bermudas, Brunei, Austrália) | 35 | Rodrigues & Samuels (1990), Rodrigues (1999), Southcott & Johnson (1997), Frohlich <i>et al.</i> (2000), Grivasan (2004) |
| <i>Paulicourea longiflora</i> (Brasil)                                                                                                                 | 6  | Souza (2001), Souza <i>et al.</i> (2004)                                                                                 |
| <i>Paullinia cupana</i> (Brasil)                                                                                                                       | 5  | Guimarães (1998)                                                                                                         |
| <i>Punica granatum</i> (Brasil)                                                                                                                        | 9  | Freire & Bezerra (2001)                                                                                                  |
| <i>Saccharum</i> sp. (Brasil)                                                                                                                          | 5  | Araújo & Kuklinsky-Sobral (2004)                                                                                         |
| <i>Spondias mombin</i> , <i>S. purpurea</i> , <i>S. tuberosa</i> (Brasil)                                                                              | 14 | Rodrigues & Samuels (1999), Freire & Bezerra (2001)                                                                      |
| <i>Stryctupos cogens</i> (Brasil)                                                                                                                      | 4  | Souza (2001), Souza <i>et al.</i> (2004)                                                                                 |
| <i>Stylosanthes</i> sp. (Brasil)                                                                                                                       | 8  | Pereira <i>et al.</i> (1993)                                                                                             |
| <i>Syagrus picrophylla</i> (Brasil)                                                                                                                    | 5  | Freire & Bezerra (2001)                                                                                                  |
| <i>Syzygium jambolanum</i> (Brasil)                                                                                                                    | 4  | Freire & Bezerra (2001)                                                                                                  |
| <i>Theobroma caçãõ</i> , <i>T. griflorum</i> (Brasil)                                                                                                  | 31 | Galvão (1998), Rubini <i>et al.</i> (2005), Hamada (2006)                                                                |
| <i>Vigna unguiculata</i> (Brasil)                                                                                                                      | 3  | Rodrigues (1999)                                                                                                         |
| <i>Zea mays</i> (Brasil)                                                                                                                               | 20 | Pimentel (2002), Pamphile & Azevedo (2002)                                                                               |

No Brasil, devido à extensão territorial e à variedade de ecossistemas, estima-se que seja alta a diversidade de fungos endofíticos, embora a maioria seja desconhecida. Estudos com algumas espécies vegetais nativas registraram grande número desses fungos: cerca de 500 espécies em palicourea (*Palicourea longiflora*, nativa da Amazônia), 340 em cacaueiro (*Theobroma cacao*, nativa de florestas tropicais úmidas), 130 em mororó (*Bauhinia brevipes*, de cerrado) e 70 em alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*, amplamente distribuída no cerrado) (Oki *et al.*, 2007).

Grande diversidade endofítica também foi relatada nos isolamentos realizados em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), bananeira (*Musa* sp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), citrus (*Citrus limon* L.), cajá (*Spondias mombin* L.), guaraná (*Paullinia cupana* Mart.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd), pueraria (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), imbaúba (*Cecropia sciadophylla*), cumaru (*Dipterix odorata*), sucuba (*Himatanthus sucuuba* Spruce), cacau (*Theobroma cacao* L.), pupunha (*Bactris gasipae*

Kunth), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), milho (*Zea mays* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), pinha, graviola e caju, dentre outros (MARIANO *et al.*, 1997; FRANKEN *et al.*, 1998; GUIMARÃES, 1998; MEDEIROS-GALVÃO, 1998; RODRIGUES; SAMUELS, 1999; DRUMOND *et al.*, 2000; MAGALHÃES, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2001; CASSA-BARBOSA, 2001; PHOTITA *et al.*, 2001; COSTA-NETO, 2002; RONDON, 2003; CRUZ, 2004; GRIVASAN, 2004; RUBINI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2009).

De acordo com Schulz e Boyle (2005) os fungos endofíticos podem ser divididos, artificialmente, em dois grupos distintos: o grupo dos balansiaceos, que especificamente coloniza gramas e o grupo dos não-balansiaceos. O primeiro grupo compreende os gêneros de ascomicetos *Epichloë* e *Balansia* e seus anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis* (SCHULZ; BOYLE, 2005), sendo encontrados crescendo de forma sistêmica e intercelular em todos os órgãos de gramíneas, resultando na transmissão vertical através das sementes (BACON; WHITE, 2000). Seus micélios apresentam estruturas especializadas para a absorção de nutrientes e muitos produzem uma variedade de metabólitos secundários (SCHULZ; BOYLE, 2005). A relação entre fungos balansiaceos e seus hospedeiros vem sendo considerada mutualista, sendo que o fungo beneficia-se com o ganho nutricional e proteção contra estresse abiótico, enquanto a planta beneficia-se pela proteção contra herbivoria através da produção de alcalóides tóxicos por parte do fungo (WHITE *et al.*, 2000; SAIKKONEN *et al.*, 2004).

O segundo grupo, os não-balansiaceos, representa um grupo diverso, correspondendo, em sua maioria, a espécies de diferentes famílias do filo Ascomycota, são mais comumente encontradas como endofíticas, sendo isoladas de todos os órgãos em praticamente quase todas as plantas terrestres (PETRINI, 1991; SCHULZ; BOYLE, 2005; STONE *et al.*, 2004), compreendendo frequentemente os ascomicetos que produzem ascostromas (Loculoascomicetos) e os que produzem peritécios (Pirenomicetos) (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Este é o maior filo dos fungos, com 50% de todas as espécies conhecidas (GUARRO *et al.*, 1999). As espécies deste filo possuem micélio compartimentalizado com septos apresentando poros simples e são reconhecidas pela presença de células reprodutivas em forma de sacos, denominadas ascos, contendo ascosporos que são formados durante a reprodução sexuada (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Representantes deste grupo ocorrem momentaneamente de maneira localizada ou sistêmica nos tecidos do hospedeiro. São cosmopolitas ocorrendo em ambientes temperados e tropicais, sendo os gêneros, *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Pleospora*, freqüentemente isolados de uma gama de hospedeiros. (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Em plantas brasileiras, espécies de *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Rhizopus* e *Xylaria* são as mais freqüentes (PEIXOTO-NETO *et al.*, 2002).

Araújo *et al.* (2005) observaram maior abundância de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia citricarpa* e *Cladosporium* sp. entre os isolados endofíticos de folhas e porta-enxertos de *Citrus*.

Bussaban *et al.* (2001) isolaram fungos endofíticos de folhas, pseudocaules e rizomas de *Amomum siamense* Criab., coletados em dois locais na Tailândia, onde *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella* spp., *Xylaria* spp. e *Phomopsis* spp. foram os fungos dominantes.

Camatti-Sartori *et al.* (2005) isolaram fungos endofíticos de folhas, flores e frutos de macieiras (*Malus domestica*) no sul do Brasil, de três sistemas de cultivo diferentes, convencional, integrado e orgânico, durante dois ciclos vegetativos. O cultivo orgânico proporcionou um maior número de isolados quando comparado ao integrado e ao convencional, e os gêneros mais freqüentes foram *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Botryosphaeria*, *Sporolomyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus*.

Photita *et al.* (2004) obtiveram isolados de *Eupatorium thymifolia*, *Draceana sanderiana* e *Colletotrichum* spp., como endofíticos de banana, soja e manga que foram identificados e agrupados de acordo com a morfologia da colônia, tamanho e formato de apressórios e conídios, bem como análise molecular baseada em seqüências ITS de rDNA.

Rubini *et al.* (2005) isolaram fungos endofíticos de plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.) resistentes e suscetíveis ao agente causal da vassoura da bruxa, o basidiomiceto *Crinipellis perniciosa*. Os endofíticos foram identificados por meio de características morfológicas e seqüenciamento de rDNA como pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia*,

*Monilochoetes*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pleurotus*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis*, *Syncephalastrum*, *Tricoderma*, *Verticillium* e *Xylaria*. Os autores identificaram ainda alguns endofíticos potencialmente antagonistas, destacando-se *Gliocladium catenulatum*, que reduziu em 70% a incidência da vassoura da bruxa in vivo em plântulas de cacaueteiro.

Santamaría e Bayman (2005) compararam comunidades de fungos epifíticos e endofíticos associadas a folhas de café (*Coffea arabica*) em Porto Rico. Foram isolados 821 microrganismos agrupados em 131 morfoespécies, *Pestalotia* e *Botryosphaeria* foram os gêneros mais comuns entre os epifíticos, enquanto *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Guignardia* foram frequentes como endofíticos. *Guignardia* não foi isolado como epifítico, apenas como endofítico.

Fungos endofíticos também já foram encontrados em bambu, e também em algas (*Sargassum thunbergii*, *S. lemaneiformis* e *Gracilaria*) (TANAKA, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

Os registros de fungos endofíticos encontrados em plantas de algodão são escassos, porém Zhang *et al.* (1996) isolaram *Fusarium* sp. associado a raízes de plantas de algodão saudáveis. E Gasoni e De Gurfinkel (1997) registraram o endofítico *Cladorrhinum foecundissimum* colonizando raízes e influenciando no crescimento e na absorção de fósforo de algodoeiro.

Segundo McGee (2002) 13 espécies de fungos podem ser registradas como endofíticas em folhas de algodão, onde as dominantes são *Alternaria* spp., *Phomopsis* spp., e *Fusarium* spp..

Na Austrália, Wang *et al.* (2007) encontraram 22 espécies de fungos endofíticos em caules de quatro espécies nativas de *Gossypium* (*G. australe*, *G. bickii*, *G. nelsonii*, *G. sturtianum*), onde *Phoma*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Botryosphaeria*, *Dichomera* e *Phomopsis* foram os gêneros mais comuns.

### 2.3.3. Especificidade dos Fungos Endofíticos ao Hospedeiro

As informações quanto à especificidade dos fungos endofíticos por determinado hospedeiro ainda são muito escassas, porém Bayman *et al.* (1997) realizaram um estudo com árvores tropicais e não encontraram nenhuma especificidade dos fungos pelo hospedeiro.

Cabe mencionar, entretanto que, existem espécies de fungos endofíticos que apresentam especificidade por um gênero ou família de determinado hospedeiro, o fungo *Phomopsis casuarinae*, por exemplo, foi relatado como endofítico específico de *Casuarina* (BOSE, 1947).

Já o *Chloroscypha chloromela* foi observado somente em *Sequoia sempervirens* (Stone, 1986), *Phyllosticta pyrolae* e *P. vaccinii* são espécies restritas a hospedeiros das Eriales (PETRINI, 1986).

Carroll (1986) relatou um outro caso de estreita especificidade entre endofítico e hospedeiro. O fungo *Rhabdocline parkeri* foi encontrado somente no pinheiro de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*, Pinaceae) e em nenhuma outra conífera simpátrica no Nordeste dos EUA.

No entanto, a situação mais freqüente é encontrar o mesmo endofítico numa ampla gama de hospedeiros. Pereira (1993) citou os fungos *Colletotrichum* sp. e *Xylaria* sp. como sendo os endofíticos comuns em hospedeiros tropicais.

Como endofíticos de ocorrência em hospedeiros pertencentes a diferentes famílias de plantas, ou seja, endofíticos ubíquos, Petrini (1991) registrou os gêneros *Geniculosporium*, *Phyllosticta*, *Phomopsis* e *Cryptocline*, enquanto Carroll (1986) citou *Cryptosporiopsis* e *Leptostroma*.

Algumas espécies de fungos endofíticos são mais freqüentes em um determinado tipo de vegetal, sendo designada de dominantes, em contraposição a outras espécies mais raras, chamadas de secundárias. Em alguns casos, constata-se poucas espécies de fungos associadas ao vegetal, enquanto que na maioria dos casos, como em *Stylosanthes* e *Musa*, é observada uma variedade enorme de gêneros e espécies (PEREIRA *et al.*, 1999; AZEVEDO, 1998).

Um padrão de dominância de espécies foi verificado por Petrini e Carroll (1981), pois um fungo isolado com maior frequência em um hospedeiro, em outro, pode ser menos freqüente. Estes menos freqüentes parecem ser também menos específicos, pois são isolados num amplo espectro de hospedeiros. E existe ainda a hipótese de que cada espécie vegetal desenvolve uma comunidade endofítica altamente específica.

Em alguns casos, pode ser observado um aparente padrão de dominância entre um ou outro táxon de fungos encontrados nas espécies de plantas investigadas. Como exemplo, *Lophodermium piceae* (Fuckel) Hohn. foi o endofítico mais freqüente de *Picea abies* Karst. (Sieber, 1988), enquanto em *Abies balsamea* (L.) Mill foi *Phyllosticta multicorniculata* (Petrini *et al.*, 1992). White Jr. e Cole (1985) consideraram um fator importante na distribuição dos endofíticos a sua especificidade pelo hospedeiro, já que uma alta proporção de hospedeiros de gêneros diferentes pode levar a uma baixa taxa de infecção, principalmente quando associada a altitudes elevadas.

#### **2.3.4. Especificidade dos Fungos Endofíticos ao Tipo de Órgão e Tecido Vegetal**

Um fenômeno que aparece registrado tanto para zonas tropicais como temperadas, é o da especificidade desses fungos endosimbiontes por determinado tecido (raízes, caules, folhas, flores e frutos) do vegetal com o qual se encontram associados. Isto tem sido registrado para fungos xilariáceos em tecidos vegetais aéreos de árvores tropicais (RODRIGUES; SAMUELS, 1990; CLAY, 1992; LODGE *et al.*, 1996; NALINI *et al.*, 2005; TEJESVI *et al.*, 2005; GOND *et al.*, 2007).

A preferência de alguns fungos endofíticos por determinados órgãos e tecidos vegetais pode ser reflexo da necessidade individual de cada fungo (LUGINBUHL; MÜLLER, 1980; VON HALMSCHALAGER *et al.*, 1993) e/ou da capacidade de utilização e sobrevivência dos fungos em um substrato específico (RODRIGUES, 1994).

A comunidade de fungos endofíticos encontrada nos diferentes órgãos vegetais pode ser influenciada pela morfologia da parte da planta, micromorfologia da superfície de cada órgão vegetal, a localização do órgão no vegetal e o seu estágio de desenvolvimento. A esses fatores devem ser adicionados o meio bioquímico, principalmente a disposição de nutrientes e a presença ou ausência de compostos fungistáticos, que é determinada pela composição e fisiologia do órgão de acolhimento

dos fungos endofíticos e da microflora associada. Mas os efeitos de tais complexidades ambientais sobre comunidades fúngicas são pouco explorados (RODRIGUES, 1994; SANTAMARIA; BAYMAN, 2005; OSONO, 2007).

O número de espécies obtidas é proporcional a variedade do tecido vegetal e também ao menor tamanho do fragmento utilizado durante o isolamento (GAMBOA *et al.*, 2002).

Em um estudo com a árvore tropical *Gynoxis oleifolia* (Asteraceae), foram observadas algumas espécies de endofíticos que eram exclusivas de raiz, enquanto que outras espécies de fungos habitavam o caule e as folhas (FISHER, 1996).

Fisher (1996) estudaram a especificidade entre os tecidos do hospedeiro e seus endofíticos, isolando *Melanconium apiocarpum* e *Cryptosporiopsis* sp. somente da casca de *Alnus glutinosa*, e nenhum endofítico do xilema.

Fungos endofíticos foram isolados de diferentes órgãos de *Amomum siamense* Criab., incluindo fohas, pseudocauls e rizomas e a maioria desses microrganismos demonstraram preferência por um dos tecidos coletados. Duas novas espécies de Ascomycetes, *Gaeumannomyces amomi* e *Leiosphaerella amomi*, foram descobertas a partir de folhas e rizomas, respectivamente, e quatro espécies de *Pyricularia*, incluindo três novas espécies, foram isolados de folhas (BUSSABAN *et al.*, 2001).

Ernest *et al.* (2003) investigaram a interação entre fungos endofíticos obtidos de diferentes órgãos de *Phragmites australis* ao longo do ano e evidenciaram que os fungos colonizavam o hospedeiro de forma diferenciada. Na primavera o endofítico foi encontrado somente na raiz, enquanto no outono, foi encontrado em todo o vegetal.

Por outro lado, esta preferência de endosimbiontes por certos órgãos vegetais não é universal para as plantas tropicais. Em Porto Rico, em orquídeas epífitas do gênero *Lepanthes*, não foram observadas diferenças significativas entre os fungos endofíticos de raízes e caules (BAYMAN *et al.*, 1997).

Pileggi (2006) isolou microrganismos endofíticos de folhas, pecíolos e sementes de *Maytenus ilicifolia*, mas nos isolamentos não foi constatada preferência dos fungos pelos órgãos analisados.

Silva *et al.* (2006) analisaram folhas, caules e raízes de plantas de pinha e graviola e somente os fungos endofíticos obtidos de pinha demonstraram preferência por um determinado tipo de tecido em detrimento de outro.

Sabe-se muito pouco acerca da distribuição dos fungos endofíticos nos tecidos de um mesmo órgão. É possível encontrar diferentes espécies em cada um dos tecidos de uma folha: parênquima, faces vasculares, derme, etc (RODRIGUES, 1994).

Santamaria e Bayman (2005) compararam comunidades de fungos epifíticos e endofíticos associadas a folhas de café (*Coffea arábica*) em Porto Rico. Os autores observaram que fragmentos de folha com *Colletotrichum* são menos prováveis de conter *Xylaria* e *Guignardia* do que os sem *Colletotrichum*, sugerindo a possibilidade de competição ou antagonismo entre os endofíticos, ou seja, *Xylaria* poderia estar restringindo o crescimento de *Colletotrichum*, importante patógeno de muitas plantas.

A maioria dos endofíticos são relatados em folhas (FRÖHLICH *et al.*, 2000; PHOTITA *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2001) e há poucos relatórios referentes ao isolamento e diversidade de endofíticos de caule, entrecasca e raízes das plantas tropicais (TEJESVI *et al.*, 2007).

### 2.3.5. Influência da Idade do Vegetal sobre Fungos Endofíticos

Muitos fatores afetam a frequência e composição das espécies microbianas como, por exemplo, a dinâmica do ambiente e a idade do vegetal (PHOTITA *et al.*, 2001; VUJANOVIC; BRISSON, 2002; PIMENTEL *et al.*, 2006; UNTERSEHER *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 1993; PETRINI, 1991; RODRIGUES; SAMUELS, 1999).

Carroll (1986) investigou a presença de fungos endofíticos associados a folhas e caules de diferentes hospedeiros e concluiu que a composição microbiana endofítica pode variar em função da idade do vegetal hospedeiro, no entanto, também devem ser considerados outros fatores relevantes como a espécie vegetal, a distribuição geográfica dessa espécie, e também a precipitação anual.

Ficher *et al.* (1995) também constataram a influência da idade da planta sobre os fungos endofíticos de folhas, caules e raízes de *Gynoxis oleifolia* Muchler (Compositae) do Equador.

Em 2001, Photita *et al.* ao isolarem fungos endofíticos de amostras de *Musa acuminata* coletadas na Tailândia, registraram uma maior incidência de fungos em tecidos mais velhos do que nos mais novos.

Pimentel *et al.* (2006) analisaram o efeito da idade de folhas de erva-mate sobre a comunidade de fungos endofíticos e como resultado, verificou que ocorre uma maior diversidade de fungos em folhas adultas do que em folhas jovens.

Stuart (2006) avaliou a comunidade de fungos endofíticos associada a plantas de cana-de-açúcar em diferentes idades, por meio do isolamento em meio de cultura e identificação molecular. O autor observou que a quantidade de fungos nas fases analisadas foi diferente, sugerindo que a idade da planta pode apresentar um efeito sobre a densidade fúngica associada à cana-de-açúcar.

Naturalmente, ocorre um aumento da incidência de fungos endofíticos nos tecidos vegetais mais velhos, porque estes teriam mais tempo para acumular fungos transmitidos tanto horizontalmente, quanto verticalmente por meio das sementes (PHOTITA *et al.*, 2001).

#### **2.4. Aplicações Biotecnológicas de Enzimas Extracelulares produzidas por Fungos**

Os fungos sintetizam inúmeros compostos de importância agrícola, industrial e farmacêutica, como vitaminas, antibióticos, enzimas, entre outros (COUTO; SANROMÁN, 2006). Dentre esses metabólitos, destacam-se as enzimas, que tem sido utilizada em diversos processos industriais e bioquímicos (GACESA; HUBBLE, 1990) e, atualmente, no estudo da relação entre patógeno–hospedeiro. Os fungos apresentam capacidade de produzir um grande número de enzimas hidrolíticas extracelulares. No entanto, o perfil enzimático pode ser variável inter ou intraespecífico, o que o torna uma alternativa, simples e rápida, no auxílio da diferenciação de espécies ou de isolados dentro de uma mesma espécie (MAHMOUD; OMAR, 1994).

As enzimas apresentam propriedades que tornam o seu uso altamente desejável como catalisadores. Elas são bastante ativas, versáteis e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido, em condições brandas de reação. Ao contrário dos catalisadores não enzimáticos que, em geral, têm ação ampla, as enzimas

não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada com relativa facilidade, bastando modificar a natureza do meio de reação, como, por exemplo, pela alteração do pH. Toda enzima, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Consequentemente, os processos industriais que empregam enzimas são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e de investimentos de baixo custo (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO; PARK, 2003).

O uso prático das enzimas tem sido explorado pelo ser humano há milhares de anos de forma direta via emprego de preparações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal ou indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos. Por outro lado, a produção e uso de enzimas de origem microbiana, sob forma controlada, apesar de serem relativamente recentes constituem, hoje, o maior setor da indústria biotecnológica (NEIDLEMAN, 1991).

A habilidade notável de degradação de compostos por microrganismos é consequência da evolução dos sistemas enzimáticos de células procariotas e eucariotas, as quais vêm coexistindo com uma variedade de substâncias naturais de diferentes origens. Esta diversidade de substratos potenciais ao crescimento microbiano resultou, então, no aparecimento de enzimas aptas a transformar moléculas orgânicas com estruturas bastante distintas. Esta resposta do metabolismo de certos microrganismos, sem dúvida, confere algumas vantagens adicionais às células microbianas, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e fontes energéticas (BOUWER; ZEHNDER, 1993).

Os fungos possuem características heterotróficas, não possuem clorofila, necessitando de material orgânico para sobreviverem, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes, através da presença de enzimas, que são produzidas e que auxiliam na degradação de todas as principais macromoléculas biológicas como as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, da mesma forma que de moléculas menores como aminoácidos, açúcares e vitaminas (SOLEWICZ, 1987, PELCZAR *et al.*, 1996).

A utilização de fungos para fins industriais e biotecnológicos nos últimos vinte anos tem aumentado rapidamente. As técnicas recentes de biologia molecular, como a

engenharia genética, oferecem oportunidades para o aperfeiçoamento de diversos processos de produção e desenvolvimento de novas enzimas (MUGGIATI, 1993; NIELSEN; OXENBOLL, 2008).

Dentre essas enzimas de interesse biotecnológico, as lipases são importantes por catalisar reações de substratos insolúveis em água, compreendendo um grupo de enzimas classificadas como hidrolases, que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA *et al.*, 2001; JAEGER; EGGERT, 2002).

As lipases são encontradas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. Recentemente, tem crescido muito o interesse pelas lipases microbianas, devido principalmente à sua maior estabilidade e diversidade quando comparadas a lipases extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura (HASAN *et al.*, 2006). Assim, a descoberta de novas lipases, a partir da seleção de microrganismos, com características desejáveis e interessantes (estabilidade a altas temperaturas e ampla faixa de pH, alta especificidade em relação a certos ácidos graxos), pode abrir promissoras perspectivas científicas e comerciais (BJÖRKLING *et al.*, 1991; SAMAD *et al.*, 1990).

As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (HASAN *et al.*, 2006).

As pesquisas relacionadas às lipases têm aumentado devido à gama de possíveis aplicações práticas na indústria, principalmente nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica. Podem ser aplicadas desde indústrias de detergentes até a síntese de compostos de alto valor agregado (RASOR; VOSS, 2001; LIESE; FILHO, 1999; PANKE; WUBBOLTS, 2002; JAEGER; EGGERT, 2002). Essas enzimas também são empregadas nos mais diversos campos da indústria de química fina, óleoquímica, couros, polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais (FREIRE; CASTILHO, 2000; SHARMA *et al.*, 2001).

Em função da busca de novas fontes de enzimas, o interesse por microrganismos tem crescido muito nos últimos anos. Existe grande apelo econômico pelas lipases microbianas, já que a maioria destas enzimas é extracelular e, desta forma, os processos

de produção e processamento das enzimas, com suas etapas de purificação, têm custo diminuído (ALONSO, 2001).

As lipases também atuam no processo de penetração dos fungos na fase de adesão no hospedeiro, antes mesmo da emissão do tubo germinativo dos conídios, liberando enzimas e favorecendo o processo de nutrição entre o agente e o hospedeiro (ALVES, 1998).

A literatura reporta que diversos gêneros de fungos filamentosos têm sido estudados como fontes de lipases, por exemplo, *Rhizopus* (PASTORE *et al.*, 2003), *Aspergillus* (MAHADIK *et al.*, 2004), *Rhizomucor* (CORDOVA *et al.*, 1998), *Penicillium* (JESUS *et al.*, 1999), *Mucor* (ABBAS *et al.*, 2002), entre outros.

A produção de lipase extracelular também foi detectada por Rapp e Backhaus (1992) em culturas submersas, em meio basal com 1% de óleo de oliva, a partir de fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo que as espécies de *Rhizopus* foram as maiores produtoras de lipase após 96h de crescimento, seguidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* após 220 horas de crescimento.

Os fungos também são hábeis em produzir proteases em substratos específicos *in vitro* e durante a colonização, degradando as proteínas que compõem o hospedeiro (ST LEGER *et al.*, 1987; VALADARES-INGLIS; AZEVEDO, 1998).

As proteases são utilizadas em processos industriais como a fabricação de detergentes, na cervejaria e panificação, e também em condições apropriadas, podem catalisar a síntese de peptídeos de alto valor comercial (BEYNON; BOND, 1989).

A habilidade em produzir proteases em meio basal sólido foi investigada em diversos fungos como *Metarhizium*, *Mucor*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Verticillium lecanii* e *Beauveria bassiana*, além de outros. A atividade proteolítica destes isolados tem sua importância quando se aponta que as proteases secretadas estão correlacionadas com o processo de penetração do fungo em seu hospedeiro (ST LEGER *et al.*, 1987; BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1994; ST LEGER *et al.*, 1996; GILLESPIE *et al.*, 1998).

Assim como a lipase e a protease, a enzima extracelular amilase, além de atuar na quebra de moléculas para a nutrição do fungo, está associada, segundo a literatura, a processos de patogênese e penetração nos hospedeiros e a atividades desenvolvidas pela

indústria (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; DUBE, 1978; EMONS *et al.*, 1977; GARRAWAY; EVANS, 1984; LACAZ *et al.*, 1984; TOMBS; BAKE, 1982; GRIFFIN, 1994).

A produção de amilase foi verificada em diversos fungos filamentosos como pode ser constatado por Domingues e Peralta (1993), que investigaram a habilidade de produção dessa enzima em meio líquido ou semi-sólido com farelo de trigo por fungos filamentosos do solo.

Estudos sobre a produção de enzimas extracelulares em meios sólidos foram apontados como favoráveis para avaliação individual do fungo e para a análise rápida de variantes genéticas, para a presença ou ausência da produção de enzimas como também para estudos ecológicos e possíveis diferenciações quimiotaxonômicas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

O uso de enzimas nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza (HASAN *et al.*, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta do Material Vegetal

O estudo foi realizado com a variedade de algodoeiro geneticamente modificada Bt (Acala 90B) para resistência a lepidópteros e sua isolinha não-Bt (Acala 90). Durante o período de maio a novembro de 2008, as plantas foram cultivadas no campo experimental do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil (14m de altitude; 08°01'009''S e 34°56'694''W).

Para o plantio, foram utilizadas sementes fornecidas pela empresa Monsanto do Brasil Ltda., e o solo utilizado para o plantio foi analisado quimicamente pelo Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características químicas do solo utilizado no cultivo dos algodoeiros transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt).

| C.O            | M.O.* | pH             | P                     | Na <sup>+</sup>                               | K <sup>+</sup> | Ca <sup>+2</sup> + Mg <sup>+2</sup> | Ca <sup>+2</sup> | Al <sup>+3</sup> | H+Al** |
|----------------|-------|----------------|-----------------------|-----------------------------------------------|----------------|-------------------------------------|------------------|------------------|--------|
| -----g/kg----- |       | (água - 1:2,5) | (mg/dm <sup>3</sup> ) | -----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ----- |                |                                     |                  |                  |        |
| 6,77           | 11,67 | 6,6            | 11                    | 0,078                                         | 0,125          | 3,60                                | 2,25             | 0,20             | 2,28   |

\*M.O.= Matéria orgânica.

\*\* H+Al= Ácido potencial.

O solo foi preparado manualmente, bem como o plantio e o controle de plantas daninhas. As plantas receberam apenas adubação de fundação com aproximadamente 10g do formulado NPK 4-14-8 por cova, não sendo utilizado nenhum tipo de controle químico.

Foram realizadas quatro coletas de amostras das plantas nos diferentes estádios do ciclo de vida da cultura, conforme Souza e Beltrão (1999): pré-floração (1-20 dias após emergência das plântulas), floração (21-60 dias após emergência), formação de maçãs (61-100 dias após emergência) e, por fim, maturação e abertura dos capulhos de algodão (101-140 dias após emergência).

Em cada coleta, foram utilizadas dez amostras de plantas de algodão, sendo cinco de algodoeiro Bt e 5 do transgênico não-Bt. As plantas de algodão foram colhidas inteiras, ao longo das quatro coletas, e conduzidas para o laboratório de Ecologia de Insetos da UFRPE (Recife-PE, Brasil), onde folhas, caules e raízes aparentemente saudáveis, ou seja, sem sintomas aparentes de manchas e lesões, foram separados individualmente, lavados em água corrente, acondicionados em sacolas plásticas e etiquetados. Durante a fase de floração também foram coletadas das amostras de plantas de algodão, flores saudáveis e durante a fase de abertura dos capulhos foram coletadas sementes. As amostras, em seguida, foram conduzidas para o laboratório de Fungos Fitopatogênicos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil e processadas em até 24 horas após a coleta.

Parte das amostras frescas utilizadas para o isolamento dos fungos endofíticos, foram colocadas em tubos Eppendorf de 1,5mL e congeladas a  $-15^{\circ}\text{C}$  para posterior verificação quanto à presença e quantificação da expressão da proteína Cry1Ac em cada parte da planta nos estádios de desenvolvimento do algodoeiro.

### **3.2. Quantificação da Proteína Cry1Ac**

Ao final das quatro coletas, as amostras armazenadas a  $-15^{\circ}\text{C}$  foram submetidas à extração da proteína Cry1Ac, seguindo os mesmos procedimentos descritos em Torres e Ruberson (2008) empregando folhas de algodoeiro.

Para a extração da proteína Cry1Ac, o material vegetal congelado foi descongelado no dia da extração, pesado, transferido dos tubos de Eppendorf para um cadinho, onde foi macerado juntamente com a solução salina tampão de extração-fosfato (1 x PBST) e Tween20, adquiridos do fabricante do kit PathoScreen® para detecção da proteína Cry1Ac/1Ab, proveniente da empresa Agdia (Agdia Inc., Elkhart, IN). A proporção de solução tampão de extração-fosfato (PBST) e material vegetal foi determinada em função da quantidade de material disponível e da concentração de Cry1Ac do material. Para folhas, flores e sementes de algodão utilizou-se a diluição 1:10 (p/v). E nas amostras menos concentradas (raízes e caules), foi feita a diluição de 1:5 (p/v).

O material obtido do maceramento em PBST foi transferido para tubos Eppendorf e congelado a -15°C até o processamento.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 5.000 rpm por 2 minutos.

A quantificação da proteína Cry1Ac foi feita mediante ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), empregando placas com poços previamente preparadas com anticorpos de interesse específicos para Cry1Ac. Em seguida, foi adicionado 100µL de solução preparada com peroxidase para catalisar o processo e 100µL do sobrenadante de cada amostra centrifugada foram transferidos para cada poço da placa ELISA. O material foi incubado em câmara úmida, por aproximadamente duas horas em condições de laboratório e em seguida foram realizadas de seis a oito lavagens das placas com PBST, sendo, posteriormente, adicionados 100µL do conjugado TMB em cada poço da placa, o que ocasionou uma alteração na coloração de cada poço. Por meio da medição da intensidade da cor da superfície de cada poço, foi possível verificar a presença e quantificar a proteína Cry1Ac.

### **3.3. Isolamento de Fungos Endofíticos**

O material vegetal reservado para o procedimento de isolamento dos fungos endofíticos foi submetido ao processo de desinfestação superficial de acordo com Araújo *et al.* (2005), para a eliminação de microrganismos epifíticos, por meio de lavagens seriadas em etanol (70%) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 4 minutos, etanol (70%) por 30 segundos e duas lavagens em água destilada esterilizada.

A eficácia do processo de desinfestação superficial foi avaliada através do plaqueamento de alíquotas da água destilada e esterilizada utilizada na última lavagem, em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, pH 6,8; contendo 200g de batata; 20g de dextrose e 15g de ágar para cada 1000mL de água; autoclavado 25 min. 120°C).

Após a desinfestação superficial, com auxílio de bisturi flambado, as amostras vegetais foram cortadas em fragmentos com 0,3cm<sup>2</sup> (folhas e flores) e 0,3cm (raízes e caules). Estes fragmentos foram transferidos, em condições assépticas, para placas de Petri (sendo um total de seis fragmentos por placa), contendo o meio de cultura Batata-

Dextrose-Ágar (BDA) suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) para inibir o crescimento bacteriano.

No caso das sementes, o isolamento de fungos endofíticos presentes nestas, foi realizado antes do plantio, com amostras das sementes cedidas pela empresa Monsanto do Brasil Ltda., e após o plantio, com amostras de sementes obtidas dos capulhos produzidos pelos algodoeiros no último estágio de desenvolvimento da planta. Dezoito sementes foram retiradas ao acaso de cada amostra. Após a desinfestação utilizando etanol (70%) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 5 minutos, etanol (70%) por 30 segundos e duas lavagens em água destilada esterilizada, o tegumento foi retirado e os cotilédones separados. De cada semente apenas um cotilédone foi plaqueado. Foram plaqueados seis cotilédones por placa em meio de cultura BDA suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) para inibir o crescimento bacteriano.

Todas as placas contendo o material vegetal (raízes, caules, folhas, flores e sementes) foram incubadas a 30°C e observadas diariamente durante 30 dias de forma a isolar tanto os microrganismos com crescimento rápido quanto os com crescimento lento. As colônias emergentes foram purificadas e preservadas em BDA para posterior identificação.

A frequência de colonização (FC%) foi calculada segundo Petrini *et al.* 1992, onde FC = número total de fragmentos com um ou mais isolados/total de fragmentos da amostra multiplicado por 100.

### **3.4. Identificação dos Fungos Endofíticos**

A identificação foi realizada na Micoteca URM do Departamento de Micologia da UFPE, Recife, Brasil, onde os fungos com esporulação abundante nas condições de cultivo foram identificados em nível de gênero ou espécie, baseando-se nas características morfológicas, por meio da observação das características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento, etc) e características microscópicas (morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas). Para tanto, foram preparadas lâminas com fragmentos das colônias dos fungos que foram observadas sob microscópio óptico. Para maior riqueza de detalhes das estruturas morfológicas dos

fungos foram preparados microcultivos. No caso das leveduras, além das características morfológicas também foram analisadas as características fisiológicas das culturas, empregando testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (LACAZ *et al.*, 2002).

Os fungos que não esporularam quando cultivados em BDA foram, ainda, transferidos para os meios de cultura Ágar Extrato de Malte e V8 Juice a fim de induzir a esporulação.

Os aspectos morfológicos e fisiológicos das culturas foram comparados com os descritos em chaves taxonômicas, com base em literatura específica (BOOTH, 1971; ELLIS, 1971; ELLIS, 1976; BUTTON, 1980; BARNETT; HUNTER, 1987; HANLIN, 2000).

Após identificação, os fungos foram depositados na Micoteca URM do Departamento de Micologia (UFPE).

### **3.5. Caracterização Enzimática dos Fungos Endofíticos**

Dentre os fungos endofíticos obtidos do algodoeiro Bt e do não-Bt, os quarenta isolados mais frequentes foram testados quanto à capacidade de produzir as enzimas hidrolíticas extracelulares lipase, protease e amilase. A atividade dessas enzimas foi determinada utilizando-se o meio específico para cada enzima, seguindo as metodologias propostas por Hankin e Anagnostakis (1975) para detecção das enzimas lipase e amilase, e por Lacaz *et al.* (2002) para a protease.

Para cada enzima, discos de 5 mm de diâmetro de micélio foram retirados dos bordos das colônias jovens dos fungos testados, cultivados em BDA por cinco dias, e transferidos para o centro das placas de Petri contendo o meio de cultura da enzima específica. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), sob luminosidade contínua, sendo avaliadas após 4 dias.

Para cada enzima foi realizado um experimento em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 40 tratamentos (isolados dos fungos encontrados) e três repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma placa de Petri contendo um disco de micélio do fungo endofítico.

Após 4 dias foi feita a avaliação da atividade proteolítica, sendo adicionada às placas uma solução acidificada de cloreto de mercúrio (12g de cloreto de mercúrio, 16g de ácido clorídrico; 1.000mL de água destilada), por 10 minutos, para a revelação do halo de degradação.

Para detecção da atividade amilolítica, foi adicionado em cada placa, após 4 dias, 5 mL de solução de lugol (1g de iodo; 3g de iodeto de potássio; 300mL de água destilada) para constatação da degradação do substrato e a visualização de um halo de degradação amarelo ao redor da colônia, que evidencia a atividade amilolítica.

A atividade lipolítica foi evidenciada por meio da presença de cristais de sais de cálcio do ácido láurico, liberados após a ação da enzima ao redor das colônias, formando um halo de degradação.

A avaliação da atividade de cada enzima consistiu na medição de dois diâmetros ortogonais da colônia e da área formada pela colônia mais o seu respectivo halo de degradação. Procurando-se comparar a atividade enzimática dos isolados fúngicos, procederam-se as avaliações da atividade lipolítica, proteolítica e amilolítica, determinando-se o índice enzimático (IE), pela relação: diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais o halo, multiplicado por 100.

### **3.6. Análise Estatística**

Os dados das frequências de colonização de fungos nas respectivas partes e idade das plantas foram testados quanto à normalidade (Kolmogorov D: normal test) e homogeneidade de variância (Bartlett's test), transformados quando necessário, e submetidos à ANOVA múltiplas em esquema fatorial considerando os algodoeiros (Bt e não-Bt), as três partes das plantas (raiz, caule e folha) e as quatro idades dos algodoeiros como fatores principais. Não havendo efeito do fator principal algodoeiro nos resultados, este fator foi retirado das futuras comparações de médias. As médias para os fatores significativos foram comparadas pelo teste de Tukey HSD (studentized range test) ao nível de 5% de significância. Todas essas análises foram conduzidas empregando o software SAS (SAS INSTITUTE, 2001).

A relação entre a frequência de fungos (variável dependente) e idade da planta em que as amostras foram coletadas (variável independente) foram submetidas a análise de regressão mediante o PROC REG do SAS, sendo o modelo escolhido quando significativo para a comparação dos resultados em função do tempo e das partes das plantas.

A abundância e diversidade de espécies fúngicas, comparando os algodoeiros Bt e não-Bt durante as quatro coletas, foram calculadas por meio do programa EstimateS (COLWELL, 2004). O índice de riqueza (S) e de diversidade pelo índice de Simpson foram estimados pelo EstimateS, sendo empregados para interpretar os efeitos sobre a comunidade de fungos encontrada.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolamento dos Fungos Endofíticos de Folhas, Caules e Raízes

O número total de fungos endofíticos isolados de folhas, caules e raízes de algodoeiro durante o desenvolvimento dessa planta foi de 261 colônias em algodoeiro Bt, sendo 118 isolados fúngicos encontrados em folhas, 78 em caules e 65 em raízes; enquanto que, em algodoeiro não-Bt foram encontrados 342 isolados fúngicos, sendo 148 colônias registradas em folhas, 101 em caules e 93 em raízes. E a análise da diversidade de fungos endofíticos associados a folhas, caules e raízes de algodoeiro, tanto no Bt quanto no não-Bt, nas condições do estudo, mostra que a comunidade de fungos endofíticos é composta por pelo menos 23 taxa e 17 gêneros: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Lecanicillium*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Talaromyces*, *Tritirachium* e *Xylaria* (Tabela 3).

Os resultados obtidos, no contexto deste trabalho, mostraram que não existe diferença estatística entre a comunidade de fungos endofíticos associada ao algodoeiro transgênico Bt e ao não-Bt de acordo com os índices de riqueza e diversidade de espécies demonstrados na tabela 3, o que indica que a presença da proteína Cry1Ac expressa nas plantas Bt não influenciou a capacidade da planta em alocar os fungos endofíticos ( $F_{1,4}=1,38$ ;  $P=0,3050$ ).

**Tabela 3.** Total de isolados fúngicos associados aos algodoeiros transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt) e distribuição dos mesmos em cada um dos órgãos (raiz, caule e folha) coletados durante todos os estádios de desenvolvimento da planta de algodão Bt e não-Bt (pré-floração, floração, formação de maçãs e abertura de capulhos).

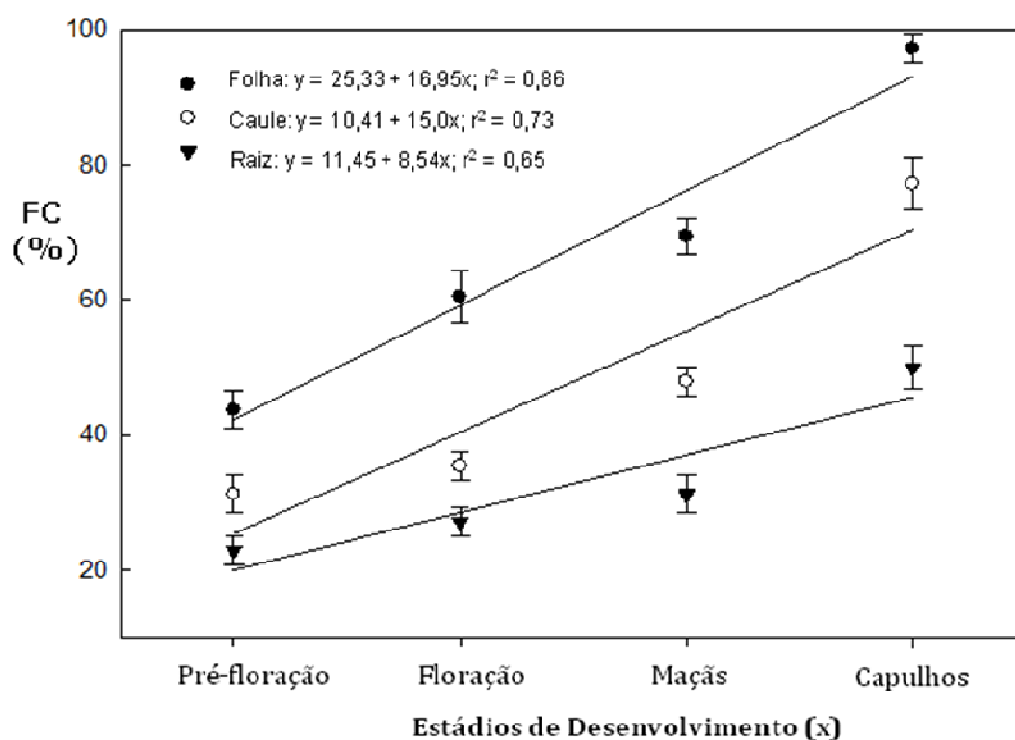
| Endophytic Fungi                                                   | Bt Cotton  |       |       |       | Non-Bt Cotton |       |      |      |
|--------------------------------------------------------------------|------------|-------|-------|-------|---------------|-------|------|------|
|                                                                    | N          | L     | S     | R     | N             | L     | S    | R    |
| <i>Acremonium fusidioides</i> (Nicot) Gams                         | 01         | 0     | 100,0 | 0     | 02            | 0     | 100  | 0    |
| <i>Acremonium kiliense</i> (Grütz)                                 | 09         | 33,3  | 22,2  | 44,4  | 08            | 25,0  | 0    | 75,0 |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) Vries                 | 04         | 0     | 25,0  | 75,0  | 05            | 0     | 20,0 | 80,0 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc         | 36         | 72,2  | 22,2  | 5,5   | 37            | 56,8  | 35,1 | 8,1  |
| <i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> (Lima & Vasconc.) Ellis | 30         | 46,6  | 30,0  | 23,3  | 33            | 48,5  | 33,3 | 18,2 |
| <i>Fusarium lateritium</i> Nees                                    | 13         | 30,7  | 61,5  | 7,6   | 19            | 21,1  | 47,4 | 26,3 |
| <i>Fusarium moniliforme</i> Sheld                                  | 0          | 0     | 0     | 0     | 02            | 100,0 | 0    | 0    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> * Schltdl                                | 13         | 30,7  | 53,8  | 15,4  | 18            | 33,3  | 55,6 | 11,1 |
| <i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld & Schrenk            | 02         | 50,0  | 50,0  | 0     | 05            | 80,0  | 0    | 20,0 |
| <i>Guignardia bidwellii</i> (Ellis) Viala & Ravaz                  | 02         | 100,0 | 0     | 0     | 04            | 75,0  | 25,0 | 0    |
| <i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimm.) Zare & Gams                   | 02         | 50,0  | 0     | 50,0  | 04            | 25,0  | 0    | 75,0 |
| <i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason                          | 05         | 80,0  | 0     | 20,0  | 12            | 50,0  | 0    | 50,0 |
| <i>Pestalotiopsis maculans</i> (Corda) Nag Raj                     | 23         | 47,8  | 34,7  | 17,4  | 35            | 48,6  | 40,0 | 11,4 |
| <i>Phoma destructiva</i> * Plowr                                   | 14         | 7,1   | 35,7  | 57,1  | 16            | 12,5  | 25,0 | 62,5 |
| <i>Phoma eupyrena</i> Sacc.                                        | 01         | 0     | 0     | 100,0 | 08            | 50,0  | 12,5 | 37,5 |
| <i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw & Hochapfel                 | 05         | 60,0  | 0     | 40,0  | 06            | 83,3  | 0    | 16,7 |
| <i>Phomopsis archeri</i> Sutton                                    | 44         | 61,3  | 27,2  | 11,4  | 56            | 60,7  | 32,1 | 7,1  |
| <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh                                  | 04         | 0     | 75,0  | 25,0  | 05            | 20,0  | 0    | 80,0 |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill                         | 14         | 7,1   | 21,4  | 71,4  | 12            | 8,3   | 25,0 | 66,7 |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> (Fresen) Harrison                      | 04         | 100,0 | 0     | 0     | 05            | 100,0 | 0    | 0    |
| <i>Talaromyces</i> sp.                                             | 10         | 0     | 60,0  | 40,0  | 16            | 0     | 50,0 | 50,0 |
| <i>Tritirachium orysae</i> (Vincens) de Hoog                       | 04         | 100,0 | 0     | 0     | 08            | 75,0  | 25,0 | 0    |
| <i>Xylaria</i> sp.                                                 | 01         | 100,0 | 0     | 0     | 03            | 100,0 | 0    | 0    |
| Non-sporulating fungi                                              | 20         | 35,0  | 20,0  | 45,0  | 23            | 21,7  | 17,4 | 60,9 |
| Total fungi isolated                                               | 261        | 118   | 78    | 65    | 342           | 148   | 101  | 93   |
| Simpson index (1/D) <sup>a</sup>                                   | 6,8 ± 2,05 |       |       |       | 9,1 ± 1,73    |       |      |      |
| Richness (S) <sup>b</sup>                                          | 18         |       |       |       | 21            |       |      |      |

N= Total de isolados fúngicos; F= Folha; C= Caule; R= Raiz.

a=Índice de Simpson para diversidade de espécies com erro estimado pelo método Jackknife ( $t = 1,56$ ;  $P = 0,2159$ ); b= Média da riqueza de espécies e respectivos Intervalos de Confiança a 95% de probabilidade da média estimado pelo método Jackknife.

\*Espécie citada como patogênica à cultura do algodoeiro.

Entretanto, foi verificado que a frequência de colonização dos fungos endofíticos aumentou, de forma linear, com o envelhecimento do vegetal, sendo maior no último estágio de desenvolvimento da planta (abertura dos capulhos), o que pode ser evidenciado em todos os tecidos amostrados (raiz, caule e folha) (Figura 3). Isto significa que a idade da planta influenciou a ocorrência de endofíticos no algodoeiro ( $F_{3,12} = 94,94$ ;  $P < 0,0001$ ), independente dos genótipos das plantas de algodão.

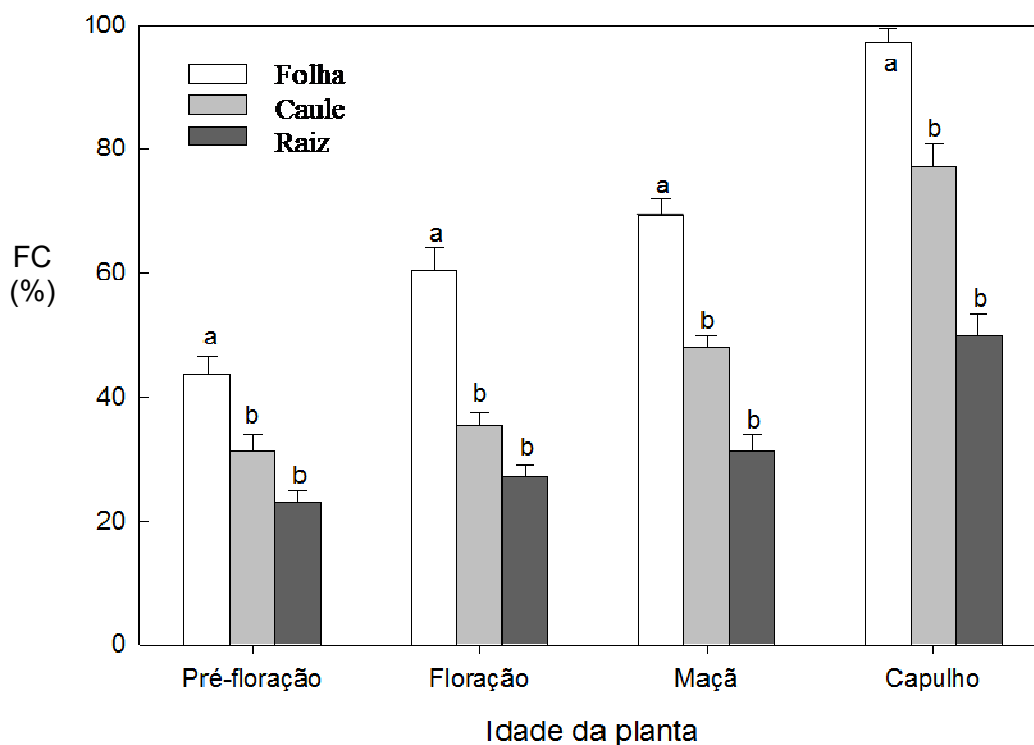


**Figura 3.** Frequência de colonização (FC%) em folha, caule e raiz em diferentes estádios de desenvolvimento da planta de algodão Bt.

Além disso, ao longo do tempo, notou-se diferença significativa entre as frequências de colonização dos fungos endofíticos nas diferentes partes da planta de algodão, indicando que o tipo de órgão do vegetal também influenciou a composição dos fungos endofíticos associados ao algodoeiro ( $F_{2,8} = 100,08$ ;  $P < 0,0001$ ), independentemente da transgenia (Figura 4). Dentre as amostras de folhas, caules e raízes coletadas ao longo de todos os estádios de desenvolvimento da planta, as folhas

apresentaram maior frequência de colonização, o que é previsto em estudos anteriores, que afirmam que essa maior taxa de colonização é devido, em parte, à complexa composição química das folhas (ABREU, 2005). Segundo Souza *et al.* (2004), as folhas dos vegetais hospedeiros devem ser, ainda, provavelmente, a primeira porta de entrada para os esporos aerotransportados, pois apresentam tecidos mais frágeis expostos a fissuras, além de aberturas naturais como estômatos e hidatódios, ocorrendo posteriormente, migração dos fungos das folhas para os demais tecidos da planta.

Os caules apresentaram relevantes taxas de colonização. De acordo com Laboratories (2004), nesses órgãos encontra-se uma grande quantidade de metabólitos secundários, destacando-se entre eles  $\sigma$ -bisabolol, o que leva a crer que a comunidade que se abriga no caule seja favorecida pela ação protetora de tais metabólitos (OTERO *et al.*, 2002; SIEBER; DOWORTH, 1994).



**Figura 4.** Frequência de colonização (FC%) nos órgãos da planta de algodão, independentemente da transgenia, nas diferentes idades da planta. Barras seguidas de mesma letra, para cada etapa do ciclo de vida da planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a expressão da proteína Cry1Ac não afeta a abundância e diversidade de fungos endofíticos associados às plantas de algodão Bt, resultado similar ao encontrado por Rui *et al.* (2005) em um estudo com bactérias da rizosfera de algodão Bt da variedade NuCOTN99<sup>B</sup>, no qual os autores não verificaram correlação entre os níveis de toxina e o número de bactérias funcionais, o que também foi constatado com os fungos obtidos neste estudo.

Os efeitos detectados no presente trabalho relacionados à comunidade fúngica estão associados à idade e parte da planta independentemente da expressão da proteína. Dessa maneira, o aumento na quantidade de fungos endofíticos ao longo do desenvolvimento da planta corrobora os resultados encontrados em outros trabalhos e ocorre, provavelmente, devido ao maior tempo de exposição das plantas a propágulos fúngicos e às mudanças fisiológicas nos órgãos das mesmas (ESPINOSA-GARCIA; LONGENHEIM, 1990; BROWN *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 1999; TAYLOR *et al.*, 1999; PHOTITA *et al.*, 2001; STUART, 2006).

Os resultados encontrados neste trabalho são similares aos resultados obtidos por outros autores que concluíram que as proteínas Cry1Ab e Cry3Bb presentes nos exsudados liberados pela raiz na rizosfera e acumuladas na biomassa de milho Bt não provocaram variação na quantidade de fungos em relação à variedade isogênica não-Bt (SAXENA; STOTZKY, 2000; VILLANY *et al.*, 2004; DEVARE *et al.*, 2004; BAUMGARTE; TEBBE, 2005).

Por outro lado, os efeitos da transgenia na comunidade de fungos associados a vegetais geneticamente modificados foram detectados em fungos da rizosfera de algodoeiros, que expressam a endotoxina de *B. thuringiensis*, sendo verificadas mudanças na composição da comunidade fúngica (DONEGAN *et al.*, 1995).

Os resultados apresentados por Stuart (2006) com cana-de-açúcar também são discordantes daqueles apresentados neste estudo, uma vez que demonstram que plantas de cana-de-açúcar transgênicas afetam determinados grupos de fungos da população endofítica associada. Contudo, esse resultado também pode estar relacionado à influência de outros fatores na interação do microrganismo com a planta, conforme aconteceu nesse estudo, onde os fatores idade e órgão da planta influenciaram a composição dos fungos endofíticos associados ao algodoeiro.

#### 4.2. Isolamento dos Fungos Endofíticos de Flores e Sementes

As espécies de fungos encontradas em flores foram as mesmas tanto no algodoeiro Bt quanto no não-Bt, sendo elas: *Rhodotorula glutinis* (Fresen) Harrison (3,57%), *Fusarium lateritium* Nees (7,14%), *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) G.A. de Vries (3,57%); *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw & Hochapfel (13,09%), *Curvularia lunata* var. *aeria* (Lima & Vasconc.) Ellis (25,00%), *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj (5,95%), *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill (4,76%), *Acremonium kiliense* Grütz (2,38%) e *Nigrospora sphaerica* (34,52%) que apresentou a maior taxa de colonização nesse órgão. Os gêneros *Cladosporium* e *Acremonium* também são comumente registrados em rosas como afirma SALAZAR; GARCIA (2005).

Nas flores analisadas não foi constatada diferença entre as médias das frequências de colonização dos fungos endofíticos encontrados tanto no algodoeiro Bt, quanto no não-Bt (Tabela 4).

**Tabela 4.** Frequência de colonização de fungos endofíticos em flores de algodoeiros transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt), coletadas durante a época de floração.

| Época de Coleta | Tipo de Algodoeiro | FC (%) |
|-----------------|--------------------|--------|
| Floração        | Bt                 | 70,66* |
|                 | Não-Bt             | 70,83* |

\*Médias de cinco repetições.

Assim como as folhas, as flores funcionam como habitats para fungos endofíticos, porém tem sido pouco estudadas. Os fungos podem colonizar as flores de seus hospedeiros por meio dos esporos aerotransportados ou utilizando insetos como vetores. A estrutura das flores pode determinar os padrões para o desenvolvimento de fungos, desse modo, enquanto a comunidade fúngica associada a flores em alguns hospedeiros se assemelha a comunidade fúngica isolada das folhas, em outros hospedeiros os fungos encontrados em folhas e flores são muito diferentes. Por exemplo, os fungos isolados de folhas e flores de trigo são espécies muito semelhantes, que penetram no vegetal por meio da atmosfera (COOKE; RAYNER, 1994; KUMAR; HYDE, 2004).

As flores muito reduzidas das gramíneas e de outros hospedeiros como *Tripterygium wilfordii* impõem condições de alto estresse, que se opõem a uma comunidade fúngica rica e variada. Em contrapartida, flores maiores como as de pepino e também as flores de algodão utilizadas nesse estudo, podem ser colonizadas por uma grande variedade de fungos, incluindo espécies de *Chaetomium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, que não são tolerantes a estresse (COOKE; RAYNER, 1994; KUMAR; HYDE, 2004).

Embora a informação sobre flores seja limitada, parece provável que a maioria das flores apresente leveduras associadas, como ocorreu com as flores de algodão nesse trabalho, e tais leveduras podem ter origem nas células que vivem dentro de botões florais ou podem ser introduzidas por insetos visitantes (COOKE; RAYNER, 1994).

Fungos endofíticos também foram isolados de flores de macieiras (*Malus domestica*) no sul do Brasil, de três sistemas de cultivo diferentes, convencional, integrado e orgânico, durante dois ciclos vegetativos e os gêneros mais frequentes entre os fungos filamentosos foram *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Botryosphaeria*, e entre as leveduras *Sporobolomyces*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, que também foi encontrado na micobiota endofítica isolada de flores de algodoeiro (CAMATTI-SARTORI *et al.*, 2005).

Nos isolamentos realizados nas sementes dos algodoeiros Bt e não-Bt, antes do plantio e depois do plantio (no último estágio de desenvolvimento da planta, após a abertura dos capulhos e exposição das sementes), foi verificada a presença de diversos fungos endofíticos.

Nas sementes analisadas antes do plantio foram registradas apenas 2 espécies de fungos endofíticos: *Nigrospora sphaerica* e *Curvularia lunata* var. *aeria*; enquanto que nas sementes analisadas após o plantio foram registradas além das espécies encontradas nas sementes analisadas antes do plantio, mais 3 espécies: *Phoma glomerata*, *Pestalotiopsis maculans* e *Fusarium lateritium*. Totalizando 5 espécies registradas nas sementes obtidas no último estágio de desenvolvimento do algodoeiro. Nas sementes, também não foram observadas diferenças entre as espécies fúngicas identificadas nos tipos de algodoeiro analisados (Bt e não-Bt). A espécie *Curvularia lunata* var. *aeria* (Lima & Vasconc.) Ellis foi a que apresentou maiores taxas de colonização nas sementes de algodoeiro (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequência de colonização de fungos endofíticos nas sementes antes do plantio e após o plantio dos algodoeiros transgênico (Bt) e não-transgênico (nãoBt).

| Fungos Endofíticos                                                 | Frequência de Colonização em Sementes |             | Frequência de Colonização em Sementes              |            |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------|------------|
|                                                                    | (Antes do Plantio)                    |             | (Após o Plantio/Último Estádio de Desenvolvimento) |            |
|                                                                    | Bt (%)                                | Não- Bt (%) | Bt (%)                                             | Não-Bt (%) |
| <i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> (Lima & Vasconc.) Ellis | 34,08                                 | 35,61       | 48,16                                              | 49,52      |
| <i>Fusarium lateritium</i> Nees                                    | -                                     | -           | 3,31                                               | 2,22       |
| <i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason                          | 20,36                                 | 20,06       | 24,10                                              | 22,60      |
| <i>Pestalotiopsis maculans</i> (Corda) Nag Raj                     | -                                     | -           | 3,00                                               | 4,44       |
| <i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw & Hochapfel                 | -                                     | -           | 15,59                                              | 15,72      |
| <b>TOTAL</b>                                                       | 54,44                                 | 55,67       | 94,16                                              | 94,50      |

Os fungos endofíticos *Nigrospora sphaerica* e *Curvularia lunata* var. *aeria* foram isolados das sementes analisadas antes do plantio, e registrados também em todas as coletas e reapareceram nas sementes produzidas nos capulhos obtidos na última fase de desenvolvimento da cultura. Isso sugere que a transmissão dos fungos endofíticos já presentes em uma planta para as gerações seguintes pode ocorrer via sementes, sendo, dessa forma, denominada de transmissão vertical. Este resultado está de acordo com Petrini *et al.* (1992) que observaram que fungos endofíticos podem ser transmitidos para plantas de forma horizontal pelo ar, ou de forma vertical, isto é, via semente (STROBEL, 2003).

Nas sementes de plantas de algodão foi verificada a alta frequência de fungos dematiáceos em relação aos demais fungos, destacando-se as espécies *Curvularia lunata* var. *aeria* e *Nigrospora sphaerica*. É possível que a alta incidência deste grupo de fungos seja devido às características de seus micélios e esporos que apresentam coloração escura e paredes espessas, as quais em geral, são mais resistentes às condições adversas, quando comparados com aqueles que apresentam esporos hialinos (NEERGAARD, 1977), podendo permanecer por muito tempo nas sementes.

Após penetrar na semente, geralmente os fungos resistentes produzem propágulos de resistência, como clamidosporos, esclerócios ou micélios dormentes, capazes de permanecer viáveis por muito tempo nas sementes. A transmissão vertical por sementes tem sido amplamente estudada em gramíneas, que podem apresentar maior proteção contra herbívoros, graças à presença de fungos endofíticos em suas sementes, pois estes produzem substâncias tóxicas denominadas alcalóides (do grupo da

caféina e da cocaína) (SAIKKONEN *et al.*, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005). É o caso do fungo endofítico *Acremonium implicatum* encontrado em *Brachiaria*, que produz uma substância que protege a planta contra pragas e doenças e aumenta a resistência do vegetal hospedeiro à seca. A semente de uma planta que contém este fungo vai gerar outra planta também com o fungo e assim sucessivamente. Os pesquisadores verificaram que os fungos endofíticos produzem algumas toxinas que afetam os fungos patogênicos e não conhecem ainda seu efeito sobre os animais em pastagens. Os principais atributos desta espécie forrageira são produtividade, tolerância à cigarrinha e a doenças, supressão de ervas daninhas, e sua adaptação à condição de baixa luminosidade (FAETH; FAGAN, 2002; FAETH; SULLIVAN, 2003; OKI *et al.*, 2007).

Os resultados encontrados nesse estudo com relação à transmissão vertical corroboram o trabalho desenvolvido por Rodrigues e Samuels (1990), que ao isolarem endofíticos de folhas não expandidas de *Licuala ramsayi*, sugeriram que sua ocorrência foi devida à transmissão por meio de sementes do hospedeiro. Da mesma forma, Marshall *et al.* (1999) observaram que o fungo endofítico *Neotyphodium* sp. é sempre transmitido às plantas descendentes de *Triticum*.

Os fungos endofíticos de ocorrência mais comum isolados dos tecidos dos algodoeiros transgênicos e não-transgênicos foram: *Phomopsis archeri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* var. *aeria* e *Pestalotiopsis maculans*. Espécies de fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Phomopsis*, *Fusarium*, *Phoma*, *Cladosporium* e *Pestalotiopsis* já foram também isolados como endofíticos, por outros autores, a partir de folhas e caules de espécies de *Gossypium* (*G. australe*, *G. bickii*, *G. nelsonii*, *G. sturtianum*). Outros fungos, entretanto, incluindo *Alternaria*, *Botryosphaeria* e *Dichomera*, descritos como endofíticos de plantas de algodão, não foram encontrados neste trabalho (MCGEE, 2002; WANG *et al.*, 2007).

Este é o primeiro estudo em que *Acremonium fusidioides*, *Acremonium kiliense*, *Curvularia lunata* var. *aeria*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium moniliforme*, *Guignardia bidwellii*, *Nigrospora sphaerica*, *Rhodotorula glutinis*, *Talaromyces* sp., *Tritirachium orysae* e *Xylaria* sp. foram registrados como endofíticos do gênero *Gossypium* sp., apesar de serem fungos comumente encontrados em outros vegetais.

Desse modo, mais de 50 % dos fungos isolados nesse trabalho ainda não haviam sido relatados como endofíticos de algodoeiro. Essa dinâmica da população de fungos endofíticos pode estar relacionada com algumas propriedades do hospedeiro como a variação da composição química (ESPINOSA-GARCIA; LANGENHEIM, 1990) e as condições fisiológicas (LAPPALAINEN *et al.*, 1999). As condições ambientais também podem influenciar na dinâmica da comunidade fúngica endofítica tanto no tempo como no espaço e sua composição de espécie pode ser alterada de um ano para outro (KINKEL, 1991).

Em relação à especificidade de colonização por órgão amostrado, dentre as espécies encontradas em algodoeiro, tanto no Bt como no não-Bt, as mais frequentes em raízes, caules, folhas, flores e sementes de plantas de algodão foram: *Phoma destructiva* Plowr em raízes (11,4%), *Phomopsis archeri* Sutton em caules (16,8%) e em folhas (22,9%), *Nigrospora sphaerica* em flores (34,52%) e *Curvularia lunata* var. *lunata* em sementes (57,78%). As espécies *Colletotricum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* var. *lunata*, *Fusarium lateritium*, *Pestalotiopsis maculans*, *Phoma destructiva*, *P. glomerata* e *Phomopsis archeri* foram generalistas, sendo encontradas em todos os tecidos.

Demonstraram especificidade: *Acremonium fusidioides*, presentes apenas em caule; *Fusarium moniliforme*, em folhas; e *Xylaria* sp. em folha. Alguns fungos parecem demonstrar certa especificidade por determinados órgãos vegetais (CLAY; SCHARDL, 2002; RODRIGUES, 1994; RODRIGUES; SAMUELS, 1990), resultado também obtido por Felizardo (2005), que, trabalhando com arnica mineira (*Licnophora pinaster*), verificou a presença de *Glomerella cingulata* apenas em amostras provenientes de folhas. Segundo Magalhães *et al.* (2008), que verificaram a presença de fungos endofíticos em candeia (*Eremanthus erythropappus*), os gêneros *Alternaria* e *Fusarium* demonstraram especificidade em semente, *Nigrospora* e *Aspergillus* em folha e *Dothiorella* em caule.

Os fatores que podem ser importantes para estabelecer tal especificidade por determinados órgãos vegetais, incluem a estrutura, textura, fisiologia e bioquímica de cada órgão, bem como a capacidade de utilização de substratos específicos pelo fungo (PETRINI; CARROLL, 1981; STONE, 1987; RODRIGUES, 1994).

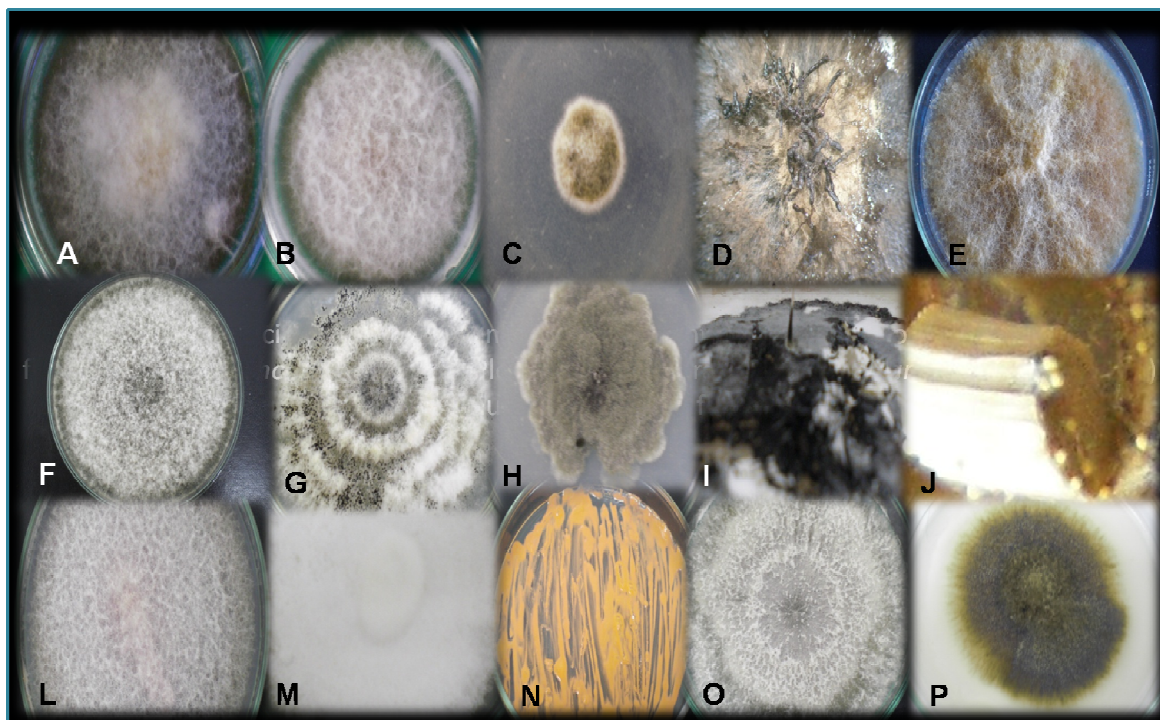
Em relação à época de coleta, as espécies mais frequentes foram: *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj (29,33%) na fase de pré-floração; *Phomopsis archeri* Sutton

(35,09) na fase de floração e (10,47%) na fase de maturação e abertura dos capulhos; e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (16,79%) na fase de formação de maçãs.

Os endofíticos encontrados em associação com o algodoeiro neste estudo são representantes dos grupos Hyphomycetes, que predominou com um maior número de espécies identificadas (43,5%), seguido por Coelomycetes (26,1%), Ascomycota (17,4%), Zygomycota (8,70%) e Blastomycetes (4,35%).

Não foi encontrado na comunidade amostrada nenhum representante do Filo Basidiomycota, indicando que as condições utilizadas podem ter desfavorecido o crescimento de basidiomicetos. Stuart (2006) encontrou resultados semelhantes ao avaliar a comunidade de fungos endofíticos de folhas de cana-de-açúcar transgênica (expressando resistência ao herbicida imazapyr) e convencional e os dados mostraram que o método dependente de meio de cultivo foi incapaz de detectar a presença de basidiomicetos.

Alguns fungos não produziram estruturas reprodutivas, e por isso não foi possível identificá-los, sendo agrupados como fungos não-esporulantes. Também não foi possível identificar a espécie de determinados gêneros de fungos, como foi o caso de *Xylaria* sp., que não produziu estruturas reprodutivas necessárias à identificação, e *Talaromyces* sp., que não exibiu a fase assexuada. Os dados obtidos mostraram que os algodoeiros Bt e não-Bt apresentam uma importante diversidade fúngica (Figura 5).



**Figura 5.** Fungos endofíticos isolados de folhas, caules, raízes, flores e sementes de algodoeiros (Bt e não-Bt). **A:** *Acremonium kiliense*; **B:** *Acremonium fusidioides*; **C:** *Cladosporium cladosporioides*; **D:** *Curvularia lunata* var. *aeria*; **E:** *Fusarium lateritium*; **F:** *Nigrospora sphaerica*; **G:** *Pestalotiopsis maculans*; **H:** *Guignardia bidwellii*; **I:** *Xylaria* sp.; **J:** *Tallaromyces* sp.; **L:** *Fusarium oxysporum*; **M:** *Lecanicillium lecanii*; **N:** *Rhodotorula glutinis*; **O:** *Phomopsis archeri*; **P:** *Phoma eupyrena* (Fotos: P. D. S. Vieira).

Alguns gêneros de fungos endofíticos isolados nesse trabalho também foram constatados em outros hospedeiros em regiões tropicais (MARIANO *et al.*, 1997; FRANKEN *et al.*, 1998; GUIMARÃES, 1998; MEDEIROS-GALVÃO, 1998; RODRIGUES; SAMUELS, 1999; DRUMOND *et al.*, 2000; MAGALHÃES, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2001; CASSA-BARBOSA, 2001; PHOTITA *et al.*, 2001; COSTA-NETO, 2002; RONDON, 2003; CRUZ, 2004; RUBINI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2009).

Os fungos *Curvularia lunata* var. *aeria* (Wakker) Boedijn e *Fusarium* foram isolados por Paz Junior e Menezes (2005) associados internamente a sementes de girassol.

O gênero *Colletotrichum* tem sido frequentemente isolado em outras plantas, sendo encontrado entre os fungos endofíticos de folhas de banana, soja, manga, café,

maçã e ainda em plantas medicinais *Artemisia annua*, *A. mongolica*, *Himatanthus sucuuba* e *Hetersmilax japonica* (BUSSABAN *et al.*, 2001, SANTAMARIA; BAYMAN, 2005; PHOTITA *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2000). Araújo *et al.* (2005) também observaram maior abundância de *Colletotrichum*, além de *Guignardia citricarpa* e *Cladosporium* sp. entre os isolados endofíticos de folhas de citros.

As espécies *Fusarium oxysporum* (agente causador da murcha de *Fusarium*) e *Phoma destructiva* (= *Phoma exigua*) são descritos na literatura como saprófitas e fitopatógenos do algodoeiro, podendo ocorrer como patógenos latentes endofiticamente, e sob condições de estresse podem manifestar a doença na planta (SAIKKONEN *et al.*, 1998). A detecção dessas espécies citadas como patogênicas à cultura do algodoeiro indica que essas estão em latência e podem causar doenças quando as condições se tornarem favoráveis. É possível que estes organismos estejam em equilíbrio com outros componentes da micobiota da cultura, impedindo a caracterização de doenças.

A presença do fungo *Lecanicillium lecanii* como endofítico de algodoeiro confirma o fato de que fungos entomopatogênicos estão presentes no interior dos tecidos de plantas e têm sido isolados como endofíticos em diversas partes das plantas. Alguns desses fungos ocorrem naturalmente como endofíticos, podendo exercer algum efeito sobre o desenvolvimento da planta hospedeira, ao passo que outros fungos são introduzidos nas plantas de diferentes maneiras, encontram-se ali acidentalmente, sem nenhuma função específica. Nesse caso, os insetos podem funcionar, hipoteticamente, como vetores dos esporos desses fungos (VEGA *et al.*, 2008).

A diversidade de fungos endofíticos encontrada no presente trabalho corrobora os resultados obtidos por Wang *et al.* (2007) em seus estudos com *Gossypium* spp.. Hawksworth (1993) reforça esses resultados quando menciona que a maioria da diversidade de fungos ainda não identificada encontra-se associada a plantas tropicais. Segundo Kinkel (1991), as altas temperatura e umidade da região tropical favorecem a comunidade endofítica. Um outro fator é que as plantas da região tropical estão mais sujeitas à pressão de inimigos naturais como fungos fitopatogênicos e, em resposta, muitas delas têm recorrido a defesas promovidas por substâncias antifúngicas produzidas, principalmente, por microrganismos endofíticos (COLEY; AIDE, 1989).

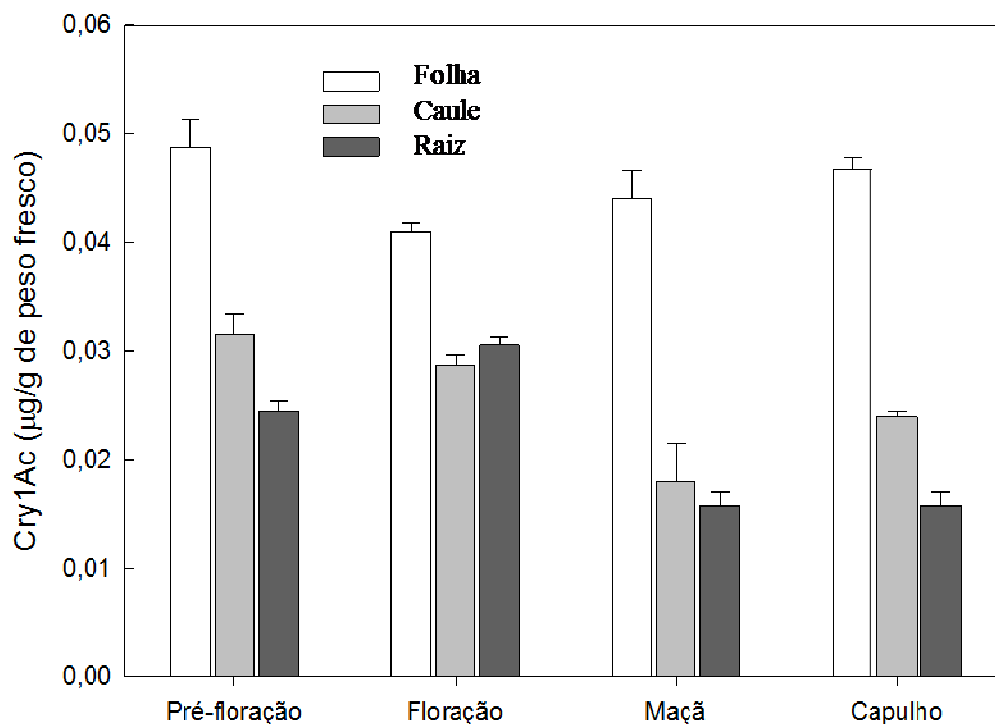
A abundância e a diversidade fúngica endofítica observada em algodoeiro indica a ocorrência da interação mutualística endofítico-hospedeiro apesar de ainda não ser possível explicar o custo e o benefício da sua presença. Segundo Read (1999), os fungos endofíticos exercem um papel fundamental na manutenção da estrutura e do funcionamento dos órgãos vitais da planta e aumentam a resistência a inimigos naturais. De acordo com Redman (2001), as chances de sobrevivência das plantas seriam mínimas sem essas associações simbióticas, uma vez que existe uma pressão muito grande por parte dos fungos fitopatogênicos. Clay (1992) sugeriu que os fungos endofíticos sobrevivem primariamente sobre o fluxo de nutrientes dos tecidos da planta. No entanto, os mecanismos dessa interação endofítico-hospedeiro ainda não estão bem esclarecidos (MÜLLER *et al.*, 2001).

Os resultados desse estudo indicam que os efeitos da transgenia e da idade das plantas são independentes, não sendo observada interação entre esses fatores. Conforme alguns trabalhos têm relatado (LOTTMANN *et al.*, 1999, 2000; HEUER, 2002; RASCH *et al.*, 2006), os efeitos detectados parecem ser secundários quando comparados com a variação decorrente da sazonalidade, de forma que a comunidade fúngica parece ser muito mais dependente da idade da planta do que da transgenia.

Os resultados apresentados neste trabalho representam o primeiro relato sobre a composição de fungos endofíticos associados a plantas de algodoeiro Acala 90 e Acala 90B e também traz contribuições para o conhecimento dos impactos que plantas transgênicas sobre a comunidade de fungos endofíticos.

#### **4.3. Quantificação da Proteína Cry1Ac**

Os procedimentos de extração e a quantificação da proteína Cry1Ac por ELISA permitiram confirmar que a planta de algodão Bt produziu essa proteína em todos os órgãos amostrados, o que comprova a existência de tal proteína interagindo com os fungos endofíticos. Os níveis de proteína Cry1Ac foram variáveis entre os diferentes órgãos da planta de algodão Bt e as folhas exibiram os maiores níveis de proteína em todos os estádios de desenvolvimento da planta, quando comparada aos caules e raízes do algodoeiro Bt (Figura 6).



**Figura 6.** Expressão da proteína Cry1Ac em diferentes órgãos da planta de algodão transgênico (Bt), em função dos estádios de desenvolvimento do vegetal.

As flores de algodão Bt apresentaram uma média de aproximadamente  $1,11 \pm 0,03$  µg de proteína/g de peso fresco. E as sementes,  $0,04 \pm 0,04$  µg de proteína/g de peso fresco.

Alguns estudos mostram que a expressão da toxina Cry1Ac ocorre em todos os estádios de desenvolvimento da cultura (HILBECK *et al.*, 2006; AVILA, 2007), mas é variável entre os órgãos da planta de algodão Bt (ADAMCZYK; SUMERFORD, 2001), confirmando os dados obtidos no presente estudo. Dessa maneira, a interação microrganismo-planta em diferentes estádios fenológicos e partes da planta deve ser amplamente considerada, dadas as diferenças no comportamento da planta.

Os resultados demonstrados aqui sugerem que não existe correlação entre a quantidade e diversidade de fungos endofíticos com a quantidade de proteína Cry1Ac produzida pelo algodoeiro, pois o aumento ou diminuição da atividade microbiana nem

sempre acompanha os níveis de proteína Cry exibidos pela planta de algodão Bt, uma vez que, por exemplo, nas folhas (parte da planta que exibiu maior quantidade de fungos endofíticos), foram detectados no primeiro estágio de desenvolvimento da cultura, altos níveis de Cry1Ac e baixa abundância e diversidade de fungos, e no último estágio de desenvolvimento foram detectados altos níveis de proteína e alta abundância e diversidade de fungos endofíticos, conforme foi mostrado na Figura 6.

A menor densidade de fungos endofíticos nas raízes, nas últimas fases de desenvolvimento da planta, pode estar relacionada à maior atividade radicular da planta durante estes estágios e, consequentemente, maior liberação de exsudados. Conforme descrito na literatura, a composição e a quantidade dos exsudados da planta varia entre espécies e estágio de desenvolvimento da planta e os exsudados radiculares têm um profundo efeito sobre a microbiota da rizosfera (JAEGER; EGGERT, 2002).

Diversos estudos demonstram a heterogeneidade de respostas da microbiota associada ao cultivo de plantas transgênicas e enfatizam a importância de se investigar cada evento de transformação (HILBECK *et al.*, 2006).

Em algodoeiro não-Bt Acala 90 não foi detectada a presença da proteína Cry1Ac.

#### 4.4. Caracterização Enzimática dos Fungos Endofíticos

Os índices enzimáticos obtidos para as enzimas hidrolíticas extracelulares lipase, protease e amilase pelos isolados endofíticos podem ser verificados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Índices enzimáticos quanto a atividade proteolítica, lipolítica e amilolítica de fungos endofíticos isolados de raízes, caules, folhas, flores e sementes de algodoeiro transgênico (Bt) e não-transgênico (não-Bt), após 4 dias de incubação à temperatura de 28°C em meios específicos para cada enzima.

| Fungo                                 | Hospedeiro  | Ie** |     |     |
|---------------------------------------|-------------|------|-----|-----|
|                                       |             | L*   | P*  | A*  |
| <i>Acremonium fusidioides</i>         | Caule NBt   | Nc   | 0,4 | 0,3 |
| <i>Acremonium fusidioides</i>         | Caule Bt    | Nc   | 0,5 | 0,3 |
| <i>Acremonium kiliense</i>            | Flor NBt    | Nc   | 0,4 | 0,4 |
| <i>Acremonium kiliense</i>            | Raiz Bt     | Nc   | 0,6 | 0,9 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Folha NBt   | 1,5  | 1,6 | 0,8 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Caule Bt    | 1,4  | 1,3 | 0,7 |
| <i>Curvularia lunata var. aerea</i>   | Caule Bt    | Nc   | 0,6 | 0,8 |
| <i>Curvularia lunata var. aerea</i>   | Flor NBt    | Nc   | 0,6 | 0,3 |
| <i>Curvularia lunata var. aerea</i>   | Semente Bt  | Nc   | 0,9 | 0,3 |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i>   | Raiz Bt     | 0,1  | 2,6 | 3,0 |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i>   | Raiz NBt    | 0,1  | 2,9 | 3,5 |
| <i>Fusarium lateritium</i>            | Flor NBt    | 0,1  | 0,4 | Nc  |
| <i>Fusarium lateritium</i>            | Caule Bt    | 0,1  | 0,4 | Nc  |
| <i>Fusarium moniliforme</i>           | Folha NBt   | Nc   | 0,2 | 0,3 |
| <i>Fusarium oxysporum</i>             | Folha NBt   | 0,3  | 0,2 | 0,1 |
| <i>Fusarium oxysporum</i>             | Caule Bt    | 0,4  | 0,2 | 0,1 |
| <i>Guignardia bidwellii</i>           | Folha Bt    | 0,7  | Nc  | 2,2 |
| <i>Guignardia bidwellii</i>           | Caule NBt   | Nc   | 1,5 | 2,1 |
| <i>Glomerella cingulata</i>           | Folha NBt   | 1,3  | 0,9 | 0,8 |
| <i>Glomerella cingulata</i>           | Caule Bt    | 1,3  | 0,6 | 0,9 |
| <i>Nigrospora sphaerica</i>           | Flor NBt    | Nc   | 0,4 | 0,2 |
| <i>Nigrospora sphaerica</i>           | Semente NBt | Nc   | 0,4 | 0,2 |
| <i>Nigrospora sphaerica</i>           | Folha Bt    | Nc   | 0,3 | 0,2 |
| <i>Pestalotiopsis maculans</i>        | Folha NBt   | 1,7  | 0,4 | 0,9 |
| <i>Pestalotiopsis maculans</i>        | Flor NBt    | 1,9  | 0,3 | 0,6 |
| <i>Pestalotiopsis maculans</i>        | Semente Bt  | 2,5  | 0,3 | 0,5 |
| <i>Phoma destructiva</i>              | Raiz Bt     | 0,2  | 0,1 | 2,0 |
| <i>Phoma destructiva</i>              | Raiz NBt    | 0,2  | 0,1 | 2,2 |
| <i>Phoma eupyrena</i>                 | Flor Bt     | 0,3  | 0,2 | 0,2 |
| <i>Phoma eupyrena</i>                 | Raiz NBT    | Nc   | 0,3 | 0,2 |
| <i>Phoma glomerata</i>                | Semente Bt  | 0,3  | 0,3 | 2,2 |
| <i>Phoma glomerata</i>                | Flor NBt    | 0,2  | 0,4 | 2,1 |
| <i>Rhizopus microsporus</i>           | Raiz NBt    | 0,5  | 0,6 | 0,2 |
| <i>Rhizopus microsporus</i>           | Raiz Bt     | 0,4  | 0,5 | 0,2 |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>            | Raiz NBt    | 0,7  | 0,5 | 0,6 |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>            | Raiz Bt     | 0,8  | 0,5 | 0,3 |
| <i>Rodothorula glutinis</i>           | Flor NBt    | 1,5  | 0,3 | Nc  |
| <i>Rodothorula glutinis</i>           | Folha Bt    | 1,1  | 0,3 | Nc  |
| <i>Verticillium lecanii</i>           | Folha NBt   | 0,3  | 1,5 | 0,5 |
| <i>Verticillium lecanii</i>           | Raiz Bt     | 0,3  | 1,7 | 0,4 |

\* L= lipase; P= protease; A= amilase.

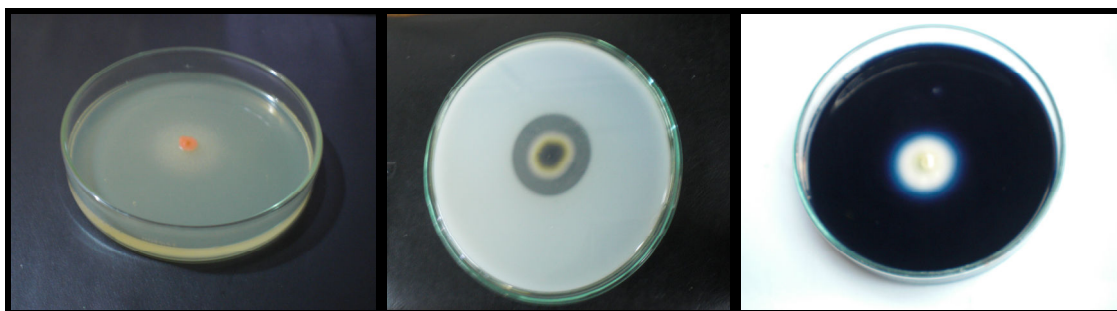
\*\* Ie= diâmetro da colônia/diâmetro da colônia+halo x 100. Médias de três repetições.

Nc= não cresceu.

Do ponto de vista prático, existem várias propostas para determinar a atividade enzimática por difusão radial em meio sólido. Os fatores determinantes que viabilizam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos microrganismos (CESKA, 1971; NETO; CUNHA, 1987; LIN *et al.*, 1991).

Para a detecção do halo de degradação formado pelos fungos para as atividades proteolíticas e amilolíticas foi indispensável o uso dos reveladores, uma vez que a visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas do meio de cultura podem interferir no corante proporcionando resultados falso-positivos (NEIROTTI; AZEVEDO, 1988).

A zona mais clara ao redor das colônias corresponde ao halo de degradação das enzimas testadas (Figura 7).



**Figura 7.** Halos de degradação produzidos pela ação de enzimas hidrolíticas extracelulares de fungos endofíticos isolados de algodoeiro (Bt e não-Bt), após 4 dias de incubação a temperatura de 28°C. A: Atividade Lipolítica; B: Atividade Proteolítica; C: Atividade Amilolítica.

Com base nos índices enzimáticos obtidos, observou-se que nem todos os fungos endofíticos analisados exibiram atividade lipásica, dos quarenta isolados testados, onze não cresceram no meio para detecção desta atividade e vinte e nove (72,5%) apresentaram atividade lipolítica, dentre estes se destacou *Pestalotiopsis maculans* isolado de semente de algodoeiro transgênico Bt por apresentar o maior índice enzimático (2,5), enquanto que os isolados de *Cladosporium cladosporioides* obtidos de raiz de algodoeiro convencional e de algodoeiro transgênico Bt, e *Fusarium lateritium* isolado de flor de algodoeiro convencional e caule de algodoeiro Bt, apresentaram os menores índices (0,1 todos). Segundo Rollof *et al.* (1987) a produção de lipases por

microrganismos não tem função totalmente conhecida, mas está relacionada com a localização e possibilidade de expansão da infecção em fungos patogênicos. Esta enzima é importante na quebra das ligações ésteres, que ligam os monômeros de ácidos graxos formadores da cutina encontrada na cutícula dos frutos.

A maioria (95%) dos fungos endofíticos analisados exibiram atividade proteolítica e dentre os isolados testados, *Cladosporium cladosporioides* obtido de raiz de algodoeiro transgênico não-Bt, apresentaram os maiores índices (2,6 e 2,9), entretanto os isolados de *Phoma destructiva* obtidos de raiz de algodoeiro convencional e transgênico Bt, apresentaram o menor índice (0,1).

Pouco é conhecido sobre o papel das proteases na penetração dos fungos nas plantas, porém, vale ressaltar que as proteases são complexos enzimáticos relativamente mais estudados em fungos e são de grande importância em processos industriais (Griffin, 1994).

Dentre os fungos testados, 27,75 % exibiram halo, evidenciando a degradação do amido, e dentre estes, destacaram-se os isolados de *Cladosporium cladosporioides* de raiz de algodoeiro transgênico não-Bt por apresentar o maior índice (3,5), enquanto que os isolados de *Fusarium oysporum* obtidos de caule de algodoeiro transgênico Bt e não-Bt apresentaram o menor índice (0,1).

A produção de amilase por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie (Griffin, 1994) e, segundo Dianese (1989), as amilases são comuns em fungos, permitindo a hidrólise do amido até glucose.

Alguns isolados não cresceram nas condições deste experimento, contudo quando cultivados em BDA apresentaram um crescimento normal.

Dentre os isolados testados para detecção enzimática, o melhor resultado foi obtido pelos isolados de *Cladosporium cladosporioides* obtidos de raiz de algodoeiro convencional e transgênico Bt, que produziram os maiores índices enzimáticos para duas das três enzimas testadas, sendo um microrganismo promissor a ser usado em diferentes setores da indústria biotecnológica.

Essas enzimas hidrolíticas clivam diferentes ligações químicas, em presença de água. Elas são produzidas por uma grande diversidade de espécies, em meio líquido e em meio sólido, e atuam sobre diferentes substratos. Durante o curso da presente

investigação foi verificado que a habilidade de várias espécies de fungos em produzir enzimas é bastante variável. Existem estudos que relatam uma possível associação entre a alta atividade enzimática dos isolados fúngicos com o alto potencial de virulência desses fungos, que, mediante condições favoráveis, podem atuar como fitopatógenos de plantas (GRIFFIN, 1994).

O fato de alguns fungos endofíticos terem apresentado atividade lipolítica, proteolítica e amilolítica, não caracteriza a fitopatogenicidade, pois, de acordo com Annis e Goodwin (1997), as diferentes izoenzimas de cada grupo de enzimas que degradam a parede celular podem ter diferentes funções incluindo a obtenção de nutrientes durante o crescimento saprofítico.

Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com outros trabalhos que relatam diversos gêneros de fungos filamentosos como fontes de lipases, proteases e amilases como, por exemplo, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Acremonium* e *Nigrospora* (PASTORE *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2006).

Os fungos com potencial em produzir enzimas extracelulares conseguem penetrar por meio da superfície intacta da planta mostram-se aptos a degradar enzimaticamente essa barreira pela produção das enzimas, o que constitui, para alguns, um fator de patogenicidade importantes na penetração e colonização dos hospedeiros (PASCHOLATI, 1995).

As enzimas degradadoras de parede celular parecem ser importantes na penetração e colonização dos fungos no hospedeiro. Entretanto, a extensão na qual a produção dessas enzimas determina a patogenicidade ainda não está clara (ISAAC, 1992).

Dessa maneira, a habilidade de um fungo secretar enzimas degradadoras de parede celular *in vitro* permite a caracterização da enzima, mas não comprova o seu envolvimento no processo patogênico. Similarmente, a degradação de paredes celulares ou tecidos isolados do hospedeiro por filtrados fúngicos ou enzimas purificadas não comprova um papel na infecção (COOPER, 1984).

## 5. CONCLUSÕES

- A modificação genética do algodoeiro transgênico Bt não influencia a composição, riqueza e diversidade de fungos endofíticos cultiváveis associados ao algodoeiro, durante as fases de desenvolvimento da cultura;
- O tipo de órgão vegetal e a idade da planta influenciam na composição dos fungos endofíticos encontrados no algodoeiro convencional e no Bt. E a quantidade de fungos endofíticos associados tanto ao algodoeiro convencional quanto ao Bt aumenta ao longo do ciclo de vida da cultura, sendo maior nas folhas e durante a fase de maturação da planta com abertura dos capulhos;
- A proteína Cry1Ac é produzida em todos os órgãos vegetais do algodoeiro Bt e durante todos os estádios de desenvolvimento da cultura, mas não influencia na comunidade de fungos endofíticos do algodoeiro;
- *Cladosporium cladosporioides*, isolado de raízes dos algodoeiros transgênico e não-transgênico, é um fungo promissor para o uso em diferentes setores da indústria biotecnológica, uma vez que apresenta índice enzimático alto para as enzimas protease e amilase; e *Pestalotiopsis maculans* isolado de semente transgênica, para a enzima lipase.
- A ocorrência de fungos endofíticos em sementes de algodoeiro sugere que há transmissão vertical desses microrganismos por meio das sementes.
- As espécies mais frequentes em algodoeiro tanto Bt quanto não-Bt são: *Phoma destructiva* em raízes, *Phomopsis archeri* em caules e em folhas, *Nigrospora sphaerica* em flores e *Curvularia lunata* var. *lunata* em sementes.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abbas, H.; Hiol, A.; Deyris, V.; Comeau, L. Isolation and Characterization of an extracellular lipase from *Mucor* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology** 31: 968-978, 2002.
- Abdou, R.; Scherlach, K.; Dahse, H.; Sattler, I. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. **Phytochemistry** 71: 110-116, 2009.
- Abreu, L.M. **Diversidade de fungos endófitos associados à planta parasita *Phoradendron perrottetti* (DC.) Eichler e sua hospedeira *Tapirira guianensis* Aubl.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 86p., 2005.
- Adameczyk, J.J.; Sumerford, D.V. Potencial factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard® cotton. **Journal of Insect Science** 1: 1-13, 2001.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C. W.; Blackwell, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley, 1996.
- Allard, R.W. **Principles of plant breeding**. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, 1960.
- Alonso, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.
- Alves, S.B. **Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens**. In S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1998.
- Annis, S.L.; Goodwin, P.H. Recent advances in the molecular genetics of lant cell wall degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology** 103: 1-14, 1997.
- Araújo, W.L.; Saridakis, H.O.; Barroso, P.A.V.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Azevedo, J.L. Variability and interations between endophytic bactéria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology** 47: 229-236, 2001.
- Araújo, W.L.; Lima, A.O.S.; Azevedo, J.L.; Marcon, J.; Sobral, J. K.; Lacava, P.T. **Manual: Isolamento de microorganismos endofíticos**. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 3ª reimpressão, Piracicaba, SP, 2005.
- Arnold, A. E.; Maynard, Z.; Gilbert, G. S.; Coley, P.D.; Kursar, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters** 107: 25-37, 2000.

Asao, H.; Arai, S.; Nishizawa, Y. Environmental risk evaluation of transgenic strawberry expressing a Rice chitinase gene. **Seibutsu-Kogaku Kaishi** 81: 57-63, 2003.

Avila, L.A. **Efeitos do algodão Bt (Bollgard evento 531) na comunidade bacteriana da rizosfera**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Azevedo, J.L. **Microrganismos endofíticos**. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.). Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998.

Azevedo, J.L.; Maccheroni, W.Jr.; Pereira, J.O.; Araújo, W.L. **Endophytic microorganism: a review on insect control and recent advances on tropical plants**. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content>>. Acesso em: 2 mar. 2006.

Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. **Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects**. In: Fungi: multifaceted microbes (B.N. Ganguli & S.K. Deshmukh, Edts.) Anamaya Publishers, New Delhi, 2007.

Bacon, C.C.W.; White, J.F. **Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae**. In: Bacon, C. J.; White, J. F. (Ed.). Microbial endophytes. New York: Macel Dekker, 2000.

Bandara, W.M.M.S.; Seneviratne, G.; Kulasooriya, S.A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences** 31: 645-650, 2006.

Barnett, H.L.; Hunter, B.B. **Illustrated genera of Imperfect Fungi**. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA, 1987.

Baumgarte, S.; Tebbe, C.C. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (Mon810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. **Molecular Ecology** 14: 2539-2551, 2005.

Bayman, P.; Lebro, L.L.; Tremblay, R.L.; Lodge, D.J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytology** 135: 143-149, 1997.

Betz, F.S.; Hammond, B.G.; Fuchs, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*- Protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 32:156-173, 2000.

Beynon R.J.; Bond J.S. Proteolytic enzymes – a practical approach, IRL Press, Oxford, 1989.

Bidochka, M.J.; Khachatourians, G.G. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology** 64: 26-32, 1994.

Björkling, F.; Godtfedsen, S.E.; Kirk, O. The future impact of industrial lipases. **Trends in Biotechnology** 9: 360-363, 1991.

Booth, C. **The genus *Fusarium***. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1971.

Borém, A. **Biotecnologia e Meio Ambiente**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 425p., 2004.

Bose, S.R. Hereditary (seed-borne) symbiosis in *Casuarina equisetifolia* Forst. **Nature** 159: 512-4, 1947.

Bouwer, E.J.; Zehnder, A.J.B. Bioremediation of organic compounds- putting microbial metabolism to work. **Trends in Biotechnology** 11: 360-7, 1993.

Bravo, A.; Gomez, I.; Conde, J.; Muñozgaray, C.; Sánchez, J.; Zhuang, M.; Gill, S.S.; Soberón, M. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. **Biochimica & Biophysica Acta** 1667:38-46, 2004.

Bravo, A., Gillb, S.S., Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49: 423-435, 2007.

Brown, K.B.; Hyde, K.D.; Guest, D.I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity** 1: 27-51, 1998.

Bruinsma, M.; Kowalchuk, G. A.; Van Veen, J. A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. **Biology and Fertility of Soils** 37: 329-337, 2003.

Bussaban, B.; Lumyong, S.; Lumyong, P.; McKenzie, E. H.; Hyde, K. D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology** 47: 943-948, 2001.

Button, C.B. **The Coelomycetes Fungi Imperfect with pycnidia, acervuli and stromata**. Commonwealth, Surrey, England, 1980.

Camatti-Sartori, V.; Silva-Ribeiro, R.T.; Valdebenito-Sanhueza, R.M.; Pagnocca, F.C.; Echeverrigaray, S.; Azevedo, J.L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology** 45: 397-402, 2005.

Cardoso, J.E.; Bezerra, M.A.; Viana, F.M.P.; Sousa, T. R. M.; Cysne, A.Q.; Farias, F.C. Endophyte occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* in cashew tissues and its transmission by vegetative propagules. **Summa Phytopathologica** 4: 262-266, 2009.

Carpenter, J.A.; Felsot, T.; Goode, M.; Hamming, D.; Onstad, S. **Comparative environmental impacts of biotechnology: derived and tradicional soybean, corn and cotton crops**. Ames: Council for Agricultural Sciense and Technology, 2002.

Carroll, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology** 69: 2-9, 1988.

Carroll, G.; Petrini, O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia** 75: 53-63, 1983.

Cassa-Barbosa, L.A. **Enzimas de interesse biotecnológico produzidas por fungos endofíticos de *Copaifera multijuga***. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 110p., 2001.

Castaldini, M.; Turrini, A.; Sbrana, C.; Benedetti, A.; Marchionni, M.; Mocali, S.; Fabiani, A.; Landi, S.; Santomassimo, F.; Pietrangeli, B.; Nuti, M. P.; Miclaus, N.; Giovannetti, M. Impacto of Bt corno in rhizospheric and soil eubacterial communities ando in beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology** 71: 6719-6729, 2005.

Ceska, M. Enzyme catalysis of solidified media. **European Journal Biochemistry** 22: 186-192, 1971.

Chen, G.; Lin, Y.; Wen, L.; Vrijmoed, L.L.P.; Jones, E.B.G. Two new metabolities of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea Coast. **Tetrahedron** 59: 4907-4909, 2003.

Clark, B.W.; Phillips, T.A.; Coats, J. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 4643-4653, 2005.

Clay, K. Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. **Natural Toxins** 1:147-149, 1992.

Clay, K.; Schardl, C. Evolutionary origins and ecological consequences of ecological endophyte symbiosis with grasses. **America Nature** 160: 99-127, 2002.

Coley, P.D.; Aide, T.M. Red coloration of tropical young leave: A possible antifungal defense? **Journal of Tropical Ecology** 5: 293-300, 1989.

Colwell, R.K. **EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples**. Version 7. User's guide and application, 2004. 2004.

Conner, A.J. The release of genetically modify crops into the environment. **The Plant Journal** 33: 19-46, 2003.

Cooke, R.C.; Rayner, A.D.M. **Ecology of Saprotrophic Fungi**. Longman, New York, 1984.

Cooper, R. M. **The role of cell wall-degrading enzymes in infection and damage**. In *Plant Diseases: Infection, Damage and Loss* (ed. R. K. S. Wood & G. j. jellis), pp. 13-27. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1984.

Cordova, J.; Nenmaowi, M.; Ismaili-Alaoui, M.; Morin, A.; Roussos, S.; Raimbault, M.; Benjlali, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 5:75-78, 1998.

Costa-Neto, P.Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunheira (*Bactris gassipae*) e caracterização por marcadores moleculares**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas, São Carlos, Brasil, 86p., 2002.

Couto, S.R.; Sanromã, M.A. Application on solid state fermentation to food industry. **A review Journal of Food Engineering**, in press, 2006.

Crickmore, N.; Ziegler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D.H. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62: 807-813, 1998.

Crickmore, N. Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology** 101:616-619, 2006.

Cruz, A.A. **Diversidade, patogenicidade e caracterização morfológica de *Colletotrichum gloeosporioides*, endofítico e patógeno**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 58p., 2004.

Dale, P.J. Spread of engineered genes to wild relatives. **Plant Physiology** 100: 13-15, 1992.

Darvas, B. **Effects of DK-440-BTY (YieldGard) *Bt*-corn pollen on *Inachis io* (Nymphalidae) larvae**. Béla Darvas Conférence du 26-29 novembre 2003, Prague. Poster de Darvas B., Institut de Protection des plantes de l'Académie des sciences hongroise, 2003.

Dessaux, Y. **Trabalhos do Institut des sciences végétales du CNRS**. Gif-sur-Yvette, Oger, Petit, Dessaux *et al.*, Le Monde, 1998.

Devare, M.H.; Jones, C.M.; Thies, J.E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: Biomass, activity, and diversity. **Journal of Environmental Quality** 33: 837-843, 2004.

Dianese, J.C. **Patologia vegetal- agressão e defesa em sistemas planta/patógenos**. Editora Universitária da Universidade de Brasília, Brasília, 1989.

Dively, G.P.; Rose, R.; Sears, M.K.; Hellmich, R.L.; Stanley-Horn, D.E.; Calvin, D.D.; Russo, J.M.; Anderson, P.L. Effects on monarch butterfly larvae (Lepidoptera: Danaidae) after continuous exposure to Cry1Ab expressing corn during anthesis. **Environmental Entomology** 33: 1116-1125, 2004.

Domingues, C.M.; Peralta, R.M.P. Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of selected strain (*Aspergillus fumigatus* fresenius). **Canadian Journal of Microbiology** 39: 681-685, 1993.

Donegan, K.K.; Palm, C.J.; Fieland, V.J.; Porteous, L.A.; Ganio, L.M.; Scaller, D.L.; Bucaro, L.; Seidler, R.J. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. **Applied Soil Ecology** 2: 111-124, 1995.

Drummond, A.A.; Medeiros-Galvão, R.S.; Costa-Neto, P.Q.; Pereira, J.O. **Fungos endofíticos isolados de cumaru (*Dipterix odorata*)**. Anais da IX jornada de iniciação científica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, 27p., 2000.

Dube, H.C. **A textbook of fungi, bacteria and viruses**. Vikas Publishing House Pvt Ltd., 239 p., 1978.

Dunfield, K.E.; Germida, J.J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiology Ecology** 38: 1-9, 2001.

Dziezak, J.D. Enzymes: catalysts for food processes. **Food Technology** 45: 78-85, 1991.

Emons, C.W.; Binford, C.H.; Utz, J.P.; Kwon-Chung, K. J. **Medical mycology**. 3 ed. Edition. Lea & Febiger, 592 p., 1977.

Garraway, M.O.; Evans, R.C. **Fungal nutrition and physiology**. John Wiley & Sons Incorporation publishers, 401 p., 1984.

Grivasan, K.P. **Studies on fungal endophytes of Aracaceae with special reference to *Cocos nucifera* L.** PhD Dissertation, Ramakrishna Mission Vivekananda College Chennai, India, 122 p., 2004.

Ellis, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 1971.

Ellis, M.B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 1976.

Ernst, M.; Mendgen, K.W.; Wiersel, S.G.R. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 16: 580-587, 2003.

Espinosa-Garcia, F.J.; Longenheim, J.H. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population – diversity and spatial patterns. **New Phytology** 116: 89-98, 1990.

Espósito, E.; Azevedo, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Edusc, 510 p., 2004.

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

Faeth, S.H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos** 98: 25-36, 2002.

Faeth, S.H.; Fagan, W. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrated and Composition Biology** 42: 360-368, 2002.

Fares, N.H.; El-Sayed, A.K. **Natural Toxins** 6: 219-233, 1998.

Faeth, S.H.; Sullivan, T.J. Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. **The American Naturalist** 161: 2-12, 2003.

Felizardo, V. de O. **Isolamento e identificação de fungos endófitos presentes em arnica mineira (*Lychnophora pinaster* Mart.)**. Monografia de Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura, Centro Universitário de Lavras, Lavras, 33 p., 2005.

Ferreira, L.H.P.L.; Suzuki, M.T.; Itano, E.N.; Ono, M.A.; Arantes, M.N.O. **Scientia Agricola** 1: 19-22, 2003.

FNP. **Agrianual: Anuário da Agricultura Brasileira. Agrianual: Mercado e perspectivas do algodão**. Instituto FNP, SP, 149 p., 2006.

Firakova, S.; Sturdikova, M.; Muckova, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia** 62: 251-257, 2007.

Fontes, E.M.G. **Avaliação da segurança ambiental de algodoeiro geneticamente modificado para resistência a insetos**. In: Rede: “Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados”, Emprapa, 69 p., 2002.

Fisher, P.; Petrini, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytology** 120:137-143, 1992.

Fisher, P.J.; Petrini, O.; Petrini, L.E.; Sutton, B.C. A study of fungal endophytes in leaves, stem and roots of *Gynoxis oleifolia* Muchler (*Compositae*) from Ecuador. **Nova Hedwigia** 60: 589-594, 1995.

Fisher, P.J. Survival and spread of the endophyte *Stagonospora pteridiicola* in *Pteridium aquilinum*, other ferns and some flowering plants. **New Phytology** 132: 119-122, 1996.

Franken, P.; Butehorn, B.; Varma, A. ***Piriformospora indica*, a cultivable root cell-infecting fungus promotes the growth of a broad range of plant species**. In: International Conference on Mycorrhiza. 2, Swenden, 1998.

Freire, E.C.; Moreira, J. de A.N. Relações genéticas entre o algodoeiro mocó e diferentes espécies e raças de algodoeiro. **Revista Brasileira de Genética** 2: 393-411, 1991.

Freire, D.M.G.; Castilho, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmácia** 81: 48-56, 2000.

Fröhlich, J.; Hyde, K.D.; Petrini, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research** 104: 1202-1212, 2000.

Fryxell, P.A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). **Rheedea** 2: 159-168, 1992.

Gacesa, P.; Hubble, J. **Tecnologia de las enzimas**. Zaragoza: Acribia S.A., 1990.

Galli, F. **Manual de fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

Gamboa, M.A.; Bayan, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica** 33: 352-360, 2001.

Gamboa, M.A.; Laureano, S.; Bayman, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia** 156: 41-45, 2002.

Gasoni, L.; De Gurfinkel, B.S. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. **Mycological Research** 101: 867-870, 1997.

Gillespie, J.P.; Bateman, R.; Charnley, A.K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locusts, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology** 71:128-137, 1998.

Gómez-Vidal, S.; Salinas, J.; Tena, M.; Lopez-Llorca, L.V. Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. **Electrophoresis** 30: 2996-3005, 2009.

Gond, S.K., Verma, V.C., Kumar, A. Study of endophytic fungal community from different parts of *Argle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (Índia). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 23: 1371-1375, 2007.

Gonthier, P.; Gennaro, M.; Nicolotti, G. Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. **Fungal Diversity** 21: 69-80, 2006.

Götz, M.; Nirenberg, H.; Krause, S.; Draeger, H. S.; Buchner, A.; Lottmann, J.; Berg, G.; Smalla, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiology** 1:1-4, 2006.

Griffiths, B.S.; Geoghegan, I.E.; Robertson, W.M. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on-target soil organisms and processes. **Journal of Applied Ecology** 37:159-170, 2000.

Griffin, D.H. **Fungal Physiology**. New York, Willy-Liss, 1994.

Grimes, D.W.; El-Zik, K.M. **Cotton**. In: Stewart, B.A.; Nielsen, D.R. *Irrigation of Agricultural Crops*. Madison: American Society of Agronomy, 1990.

Guarro, J.; Gene, J.; Stchigel, A.M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews** 12: 454-500, 1999.

Guerrante, R.D.S. **Potenciais riscos e benefícios da tecnologia dos OGMs**. In: Guerrante, R.D.S. (Ed.). *Transgênicos: uma visão estratégica*. Interciência, 2003.

Guimarães, V.C. **Isolamento de Fungos Endofíticos de Hospedeiro *Paulinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mar) Duche e Análise da Variabilidade Genética Detectada por Marcadores RAPD no Endofítico *Glomerella cingulata***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 115p., 1998.

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

Guo, L.D.; Hyde, K.D.; Liew, E.C.Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist** 147: 617-630, 2000.

Halin, R.T. **Illustrated genera of Ascomycetes**. APS Press. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA, 2000.

Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W. F.; Kloepper, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology** Ottawa, 43: 895-914, 1997.

Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. The use of the solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** 67: 597-607, 1975.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. **Industrial applications of microbial lipase**. *Enzyme and Microbial Technology*, in press, 2006.

Hawksworth, D.L. **The tropical fungal biota: census, pertinence, prophylaxis and prognosis**. In: Isaac, S.; Frankland, J.C.; Watling, R.; Whalley, A.J.S. (Eds.). Aspects of tropical micology. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 265-293, 1993.

Hawksworth, D.L. The variety of fungal-algal symbiosis, their evolutionary significance, and the nature of lichens. **Botanical Journal of the Linnean Society** 96: 3-20, 1998.

Hawksworth, D.L. How many fungi are there? **Mycological Research** 104: 4-5, 2000.

Heuer, H. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology** 68: 1325-1335, 2002.

Hilbeck, A.; Andow, D.A.; Fontes, E.M.G. **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessment Bt cotton in Brazil**. Wallingford, CABI, 2006.

Höfte, H.; Whiteley, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews** 2: 242-255, 1989.

Huang, Y.; Wang, J.; Li, G.; Zheng, Z.; Su, W. Tumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 31: 163-167, 2001.

Hyde, K.D.; Soyong, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity** 33: 163-173, 2008.

Hyde, K.D.; Zhang, Y. Epitypification: should we epitypify? **Journal of Zhejiang University-Science** 9: 842-846, 2008.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Algodão Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 29 set. 2009.

ISAAC, S. **Fungal-Plant Interactions**. Cambridge: Chapman & Hall, 418p., 1992.

Jaeger, K.; Eggert, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** 13: 390-397, 2002.

Jesus, M.F.C.P.; Branco, R.N.; Sant'Anna, Jr.G.L.; Freire, D.M.G.; Silva, Jr. J.G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degree of purity. **Braslian Journal of Chemical Engineering** 16: 113-118, 1999.

Johnson, K.S.; Scriber, J.M.; Nitao, J.K.; Smitley, D.R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to 3 nontarget lepidoptera in-field studies. **Environmental Entomology** 24: 288-297, 1995.

Johri, B.N. Endophytes to the rescue of plants! **Current Science** 90: 1315-1316, 2006.

Kinderlerer, J. **Effects on non-target organisms of the release of genetically modified crops into the environment**. In: Safety of Genetically Engineered Crops (Custers, R., ed.). Zwijnaarde, Belgium: Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, 2001.

Kinkel, L. **Fungal community dynamics**. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (Eds.). Microbial ecology of leaves. New York: Springer-Verlag, 1991.

Klich, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. United States Department of Agriculture. New Orleans, Louisiana USA, 2002.

Knox, O.G.G.; Nehl, D.B.; Mor, T.; Roberts, G.N.; Gupta, V.V.S.R. Genetically modified cotton has no effect on arbuscular mycorrhizal colonisation of roots. **Field Crops Research** 109: 57-60, 2006.

Kogel, K.H.; Franken, P.; Hükelhoven, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology** 9: 358–363, 2006.

Kumala, S.; Utji, R.; Sudarmono, P.; Kardono, L.B.S. Isolation of endophytic fungi from *Brucea javanica* (L.) Merr and cytotoxic evaluation of their n-butanol. Extract from Fermentation Broth. Pak. **International Journal of Biological Sciences** 9: 825-832.

Kumar, D.S.S.; Hyde, K.D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity** 17: 69-90, 2004.

Laboratories LBVH.  **$\sigma$ -bisabolol in stem**. Disponível em: <<http://www.labo-hevea.com/taripro>>. Acesso em: 25 nov. 2004.

Lacaz, C. S. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 7ª Edição. Ed. Sarvier São Paulo, 470p., 1984.

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Heins-Vacari, E.M.; Melo, N.T.; Martins, J.E. **Guia para identificação de Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. 1ª ed. São Paulo: Savier, 2002.

Lappalainen, J.H.; Koricheva, J.; Helander, M.L.; Haukioja, E. Densities of endophytic fungi and performance of leafminers (Lepidoptera: Eriocraniidae) on birch along a pollution gradient. **Environmental Pollution** 104: 99-105, 1999.

Legault, D., Dessureault, M., Laflamme, G. Mycoflore des aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa* L. Champignons endophytes. **Canadian Journal of Botany** 67: 2053-2060, 1989.

Lereclus, D.; Delécluse, A.; Lecadet, M.M. **Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes**. In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. (Eds.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester : John Wiley & Sons, 1993.

Lewis, L.C.; Bruck, D.J.; Gunnarson, R.D.; Bidne, K.G. Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and non-transgenic and non-transgenic corn. **Crop Science** 41, 1395-1400, 2001.

Li, J.Y.; Strobel, G.A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry** 57: 262-265, 2001.

Li, J.Y.; Strobel, G.A.; Harper, J.K.; Lobkovsky, E.; Clardy, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters** 2: 767-770, 2000.

Li, W.C., Zhou, J., Guo, S.Y., Guo, L.D. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. **Fungal Diversity** 25: 69-80, 2007.

Li, L.; Sattler, I.; Deng, Z.; Groth, I.; Walther, G.; Menzel, K.; Peschel, G.; Grabley, S.; Lin, W. A-*seco*-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HKI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. **Phytochemistry** 69: 611-517, 2008.

Liese, A.; Filho, M.F. Production of fine chemicals using biocatalysis. **Current Opinion in Biotechnology** 10: 595-603, 1999.

Lightwood, D.J.; Ellar, D.J.; Jarrett, P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 5174-5181, 2000.

Lin, J.E.; Chang, D.C.N.; Shen, G.J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechniques** 5: 275-280, 1991.

Liu, C.I.; Zou, W.X.; Lu, I.; Tan, R.X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology** 88, 277-282, 2001.

Liu, B.; Zeng, Q.; Yan, F.; Xu, H.; Xu, C. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and soil** 27: 1-13, 2005.

Lodge, D. J.; Fisher, P. J.; Sutton, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia** 88: 733-738, 1996.

Losey J.E.; Rayor, L.S.; Carter, M.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature** 6733: 214-217, 1999.

Lottmann, J. Influence of transgenic T4 lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology** 33: 41-49, 1999.

Lu, H.; Zou, W.X.; Meng, J.C.; Hu, J.; Tan, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science** 151: 67-73, 2000.

Luginbuhl, M.; Müller, E. Endophytische Pilze den oberirdischen organen von 4 gemeisam an gleichen Standorten achsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*). **Sydowia** 33: 185-209, 1980.

Magalhães, A.A.S. **Isolamento e variedade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus sucuuba* Spruce (Wood) Apocynaceae.** Dissertação de Mestrado, Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 130p., 2000.

Magalhães, W.C.S.; Missagia, R.V.; Costa, F.A.F.; Costa, Maria Cristina Mendes. Diversidade de Fungos Endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **Cerne** 14: 267-273, 2008.

Mahadik, N. D.; Bastawdi, K. B.; Puntambekar, U. S.; Khire, J. M.; Gokhale, D. V. Production of acidic lipse by a mutant *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation process. **Biochemistry** 39: 2031-2034, 2004.

Mahmoud, A.L.E.; Omar, S.A. Enzymatic activity and mycotoxin-producing potencial of fungi isolated from rotted lemons. **Cryptogamie Mycologie** 15:117-124, 1994.

Mariano, R.L.R.; Lira, R.V.I.; Silveira, E.B.; Menezes, M. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no Nordeste do Brasil. Frequência da população fúngica e efeito da hospedeira. **Agrotópica** 9: 127-134, 1997.

Marinho, A.M.R.; Rodrigues-Filho, E.; Moitinho, M.L.R.; Santos, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as na endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16: 280-283, 2005.

Marshall, D.; Tunali, B.; Nelson, L.R. Occurrence of fungal endophytes in species of wild *Triticum*. **Crop Science** 39: 1507–1512, 1999.

McGee, P. A. Reduced growth and deterrence from feeding of the insect pest *Helicoverpa armigera* associated with fungal endophytes from cotton. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 42: 995–999, 2002.

Meadows, M. P. ***Bacillus thuringiensis* in the environment- ecology and risk assessment.** In: Entwistle, P. F.; Cory, J. S.; Bailey, M. J.; Higgs, S. (Ed.). *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide; theory and practice*. Chichester: J. Wiley. pp. 193-220, 1993.

Medeiros-Galvão, R.S. **Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais freqüentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 151p., 1998.

Melnroy, J.A.; Kloepper, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and soil** 173: 337-342, 1995.

Muggiati, A. Enzimas crescem como o detergente. **Química e Derivados** 2: 20-25, 1993.

Mulder, C.; Wouterse, M.; Raubuch, M.; Roelofs, W.; Rutgers, M. Can transgenic maize affect soil microbial communities? **PLoS Computational Biology** 9: 1165-1172, 2006.

Müller, 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** 10: 1801-1810, 2001.

Munkvold, G.P.; Hellmich, R.L.; Rice, L.G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. **Plant Disease** 83:130-138, 1999.

Nalini, M.S.; Mahesh, B.; Tejesvi, M.V.; Prakash, S.H.; Subbaiah, V.; Kini, K.R.; Shetty, H. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) D.C. (Caparidaceae). **Mycopathologia** 159: 245-249, 2005.

Neergaard, P. **Seed pathology**. London. UK. Macmillan Press, 1977.

Neirotii, E.; Azevedo, I.L. Técnicas semiquantitativas de avaliação de produção de celulase em *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia** 19: 78-81, 1988.

Neidleman, S.L. Enzymes in the food industry: a backward glance. **Food Technology** 45: 88-91, 1991.

Neto, J.A.; Cunha, B. C. de A. Método rápido para a triagem de fungos amilolíticos e seus mutantes. **Revista de Microbiologia** 18: 264-268, 1987.

Nielsen, R. I.; Oxenboll, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist** 12: 69-71, 1998.

Obrycki, J.J.; Rise, M.E.; Lewis, L.C. Uptake of *Bt* endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic agroecosystem, **Molecular Ecology** 14: 2.815-2.823, 2005.

Oki, Y.; Fernandes, G.W.; Correa Junior, A. Fungos: amigos ou inimigos? **Ciência Hoje** 252:64-66, 2007.

Osono, T. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. **Mycoscience** 48: 47-52, 2007.

Otero, J.T.; Ackerman, J.D.; Bayman, P. Diversity and host specificity of endophyte *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal Botany** 89: 1852-1858, 2002.

Palm, C.J. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* g-endotoxin. **Canadian Journal Microbiology** 42: 1.258-1.262, 2002.

Panaccione, D.G.; Johnson, R.D.; Wang, J.; Young, C.A.; Damronkool, P.; Scott, B.; Schardt, C.L. Elimination of ergovaline from grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences** 98: 12820-12825, 2001.

Panke, S.; Wubbolts, M.G. Enzyme technology and bioprocess engineering. **Current Opinion in Biotechnology** 13: 111-116, 2002.

Pascholati, S.F. **Fitopatógenos: arsenal enzimático**. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.) Manual de fitopatologia. Vol.1 Princípios e conceitos 3a. Ed. São Paulo SP. Ceres. pp. 343-364, 1995.

Passos, S.M.G. **Algodão**. In: \_\_\_\_\_. Campinas – São Paulo. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1977.

Pastore, G. M.; Da Costa, V. S. R.; Koblit, M. G. B. Purificação parcial e caracterização de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 23: 135-140, 2003.

Patel, R.N. Microbial/ enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology** 31: 804-826, 2002.

Paz Junior, F.B., Menezes, M. Fungos endofíticos em sementes de girassol e diferenciação morfológica e enzimática de espécies de *Fusarium*. **Summa Phytopathologica** 31: 87-93, 2005.

Peferoen, M. **Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes**. In: A.M.R. Gatehouse; V.A. Hilder; D. Boulter (eds.), Plant genetic manipulation for crops protection. Wallingford, CAB, 1992.

Peixoto-Neto, P.A.S.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 29: 32-37, 2002.

Pelczar Jr., M.J.; Chan, E.E.C.S.; Krieg, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, Makson Books, 1996.

Pereira, I.O.; Azevedo, J.L.; Petrini, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia** 85: 362-364, 1993.

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 and Biotechnology** 15: 37-40, 1999.

Petrini, O.; Carroll, G.C. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. **Canadian Journal of Botany** 59: 629-636, 1981.

Petrini, O. **Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues**. In: Fokkema, N.J.; Heuvel, J. van Den (Eds.) *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

Petrini, O. **Fungal endophytes of tree leaves**. In: Andrewa, J.; Hirano, S. S. 1991. (Ed.). *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer Verlag, 1991.

Petrini, O.; Stone, J.; Carroll, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany** 60: 789-796, 1992.

Photita, W.; Lumyong, S.; Lumyong, P.; Hyde, K.D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research** 105: 1508-1514, 2001.

Photita, W.; Lumyong, S.; Lumyong, P.; McKenzie, E.H.C.; Hyde K.D. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity** 16, 131-40, 2004.

Phongpaichit, S.; Rungjindamai, N.; Rukachaisirikul, V.; Sakayaroj, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 48: 367-372, 2006.

Pileggi, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. Por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Dissertação de Doutorado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

Pimentel, I.C.; Kuczkowski, F.R.; Chime, M.A.; Auer, C.G.; Junior, A.G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta** 1: 123-128, 2006.

Pizarro, A.V.L.; Park, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry** 38: 1077-1082, 2003.

Qin, J.C.; Gao, J.M.; Zhang, Y.M.; Yang, S.X.; Bai, M.S.; Ma, Y.T.; Laatsch, H. Polyhydroxylated steroids from an endophytic fungus, *Chaetomium globosum* ZY-22 isolated from *Ginkgo biloba*. **Steroids** 74:786-90, 2009.

Rani, A.; Balaraman, S. **Indian Journal Exp. Biology** 33: 1.241-1.244, 1996.

Rapp, P., Backhaus, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology** 14: 938-943, 1992.

Rasch, F.; Velvis, H.; Zachow, C.; Berg, G.; Van Elsas, J.D.; Sessitsch, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology** 43: 555-5566, 2006.

Rasor, J.P.; Voss, E. Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. **Applied Catalysis A: General** 221: 145-158, 2001.

Read, D.J. **Mycorrhiza – the state of the art**. In: Varma A.; Hock, B. (Eds.). Mycorrhiza. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1999.

Redman, R.S.; Dunigan, D.D.; Rodriguez, R.J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist** 151, 705–716, 2001.

Roberts, D.H.; Lehar, J.; Dreher, J. W. Time series analysis with CLEAN I derivation of a spectrum. **The Astronomical Journal** 93: 968-989, 1987.

Rodrigues, K.F. The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia** 86: 376-385, 1994.

Rodrigues, K.F.; Samuels, J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycological Research** 94: 827-830, 1990.

Rodrigues, K.F.; Petrini, O. **Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions**. In: Diversity of Tropical Microfungi. University of Hong Kong Press, 1997.

Rodrigues, K.F.; Samuels, G.J. Fungal endophytes of *Spodias mombin* leaves in Brasil. **Journal Basic Microbiology** 39: 131-135, 1999.

Rollof, S.; Hedstrom, S. A.; Nilsson-Ehle, P. Purification and characterization of a lipase from *Staphylococcus aureus*. **Bioquímica & Biophysica Acta** 921: 363-369, 1987.

Rondon, A.C.F. **Atividade amilolítica de fungos endofíticos isolados de *Manihot esculenta***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, 100p., 2003.

Rubini, M.R.; Silva-Ribeiro, R.T.; Pomella, A.W.V.; Maki, C.S.; Araújo, W.L.; Santos, D. R. dos; Azevedo, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences** 1: 24-33, 2005.

Rui, Y.K.; Yi, G.X.; Zhao, L.; Wang, B.M.; Li, Z.H.; Zhai, Z.X.; He, Z.P.; Li, Q.X. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 2: 1279-1284, 2005.

Rungjindamai, N.; Pinruan, U.; Choeyklin, R.; Hattori, T.; Jones, E.B.G. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal Diversity** 33: 139-161, 2008.

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** 29: 319-343, 1998.

Saikkonen, K.; Wäli, P.; Helander, M.; Faeth S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Science** 9: 275-280, 2004.

Salazar, C.S., García, M.C.C. Aislamiento de hongos endofitos em rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. **Revista Iberoamericana Micología** 22: 99-101, 2005.

Samad, M.Y.A.; Salleh, A.B.; Razak, C.N.A.; Ampou, K.; Yunus, W.M.Z.; Basri, M. A lipase from a newly isolated thermophylic *Rhizopus rhizopodiformis*. **Word Journal Microbiology and Biotechnology** 6: 390-394, 1990.

Samuels, G.J. *Trichoderma ovalisporium: A new endophytic species with potential to control frosty pod rot of cocoa*. Mycology Program, 2004.

Sánchez Márquez, S.; Bills, G.F.; Zabalgogezcoa, I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. **Fungal Diversity** 33: 87-100, 2008.

Santamaria, J.; Bayman, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology** 50: 1-8, 2005.

Saxena, D.; Stotzky, G. Bacillus thuringiensis (Bt) toxin released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. **FEMS Microbiology Ecology** 33: 35-39, 2000.

Saxena, D.; Stotzky, G. Fate and effects of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. **ISB News Report** 1: 5-7, 2001.

Scalla, R. **Laboratoire des xénobiotiques des plantes**. Inra Toulouse, Colloque médical du Sud Aveyron, 2000.

Schardl, C.L.; Phillips, T.D. Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? **Plant Disease** 81, 430-438, 1997.

Schardl, C.L.; Grossman, R.B.; Nagabhyru, P.; Faulkner, J.R.; Mallik, U.P. Loline alkaloids: currencies of mutualism. **Phytochemistry** 68: 980-996, 2007.

Selosse, M.A.; Baudoin, E.; Vandenkoornhuyse, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies** 327: 639-648, 2004.

Séralini, G.E.; Cellier, D.; Vendomais, J. New analysis of a rat feeding study with genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. **Archives of Environmental Contamination Toxicology** 52: 596-602, 2007.

Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances** 19: 627-662, 2001.

Sieber, T.N.; Dorworth, C.E. An ecological study about assemblages of endophyte fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia: in search of candidate mycoherbicides. **Canadian Journal Botany** 1: 1-72, 1994.

Silva, R.L.O.; Luz, J.S.; Silveira, E.B.S.; Cavalcante, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica** 20: 649-655, 2006.

Siqueira, V.M. **Fungos endofíticos de folhas e caules de *Lippia sidoides* Cham. E avaliação da atividade antimicrobiana.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil, 94 p., 2008.

Steele, D.B.; Stowers, M.D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Reviews Microbiology** 45: 89-106, 1991.

Solewicz, E. **Biotecnologia: Enzimas na Síntese Orgânica**, INT, 1987.

Souza, J.G.; Beltrão, N.E.M. **Fisiologia.** In: Beltrão, N.E.M. (Ed.). O agronegócio do algodão no Brasil. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília, DF, 1999.

Souza, A.Q.L.; Souza, A.D.L.; Astolfi Filho, S.; Pinheiro, M.L.B.; Sarquis, M.I.M.; Pereira, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazonica** 34: 185-195, 2004.

Shelton, A.M.; Sears, M.K. The monarch butterfly controversy: Scientific interpretations of a phenomenon. **The Plant Journal** 27: 483-488, 2001.

Schnepf, E.; Crickmore, N.; Vanrie, J.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Review** 62:775-806, 1998.

Schulz, B.; Wanke, U.; Draeder, S.; Aust, H.J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness on surface sterilization methods. **Mycological Research** 97: 1447-1450, 1993.

Schulz, B.; Boyle, C. The endophytic continuum. **Mycological Research** 109: 661-686, 2005.

Sticher, L.; Mauch Mani, B.; Metraux, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology** 35: 235-270, 1997.

Stone, J.K. Initiation and development of latent infection by *Rhabdochne parkeri* on Douglas fir. **Canadian Journal of Botany** 65: 2614-2621, 1987.

Stone, J.K.; Polishook, J.D.; White, Jr.J.F. Endophytic Fungus. In: Mueller, J.M.; Bills, G. F.; Foster, M.S. **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. San Diego, Elsevier Academic Press, 2004.

Strobel, G.A.; Ford, E.; Li, J.Y.; Sears, J.; Sidhu, R.S.; Hess, W.M. *Seimatoantherium tepuiense* gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System. **Applied Microbiology** 22: 426-433, 1999.

Strobel, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection** 5: 535-534, 2003.

Strobel, G.; Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 67: 491-502, 2003.

Strobel, G.A. Microbial gifts from rain forests. **Canadian Journal of Plant Pathology** 24: 14-20, 2004.

Strobel, G.; Daisy, B.; Castilho, U.; Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products** 67: 257-268, 2004.

Stuart, R.M. Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 65 p., 2006.

St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 253: 221-232, 1987.

St. leger, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W.; Roberts, D.W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **Applied and Environmental Microbiology** 62:1257-1264, 1996.

Taechowisan, T.; Peberdy, J.F.; Lumyong, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 19: 381-385, 2003.

Tan, R.X.; Zou, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports** 18: 448-459, 2001.

Tanaka, E. Specific In Situ Visualization of the Pathogenic Endophytic Fungus *Aciculosporium take*, the Cause of Witches' Broom in Bamboo. **Applied and Environmental Microbiology** 14: 4829-4834, 2009.

Tao, G.; Liu, Z.Y.; Hyde, K.D.; Lui, X.Z.; Yu, Z.N. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). **Fungal Diversity** 33: 101-122, 2008.

Taylor, J.E.; Hyde, K.D.; Jones, E.B.G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarps fortunes*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist** 142: 335-346, 1999.

Tatli, F.; Gullu, M.; Ozdemir, F. Determination of fungi species, relationships between ear infection rates and fumonisin quantities in Bt maize. **Bulletin Oilb** 27: 161-164, 2004.

Tejesvi, V.M.; Mahesh, B.; Nalini, M.S.; Prakash, H.S.; Kini, K.R.; Subbiah, V.; Shetty, H.S. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 21: 1535-1540, 2005.

Tombs, M.P.; Blake, G.G. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 700, p. 81-89, 1988.

Torres, J.B.; Ruberson, J.R. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. **Transgenic Research Dordrecht** 17, 345-354, 2008.

Torres, J.B.; Ruberson, J.R.; Whitehouse, M. **Transgenic cotton for sustainable pest management: a review**. In: E. Lichtfouse. Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants: Sustainable Agriculture Reviews. Dordrecht, Springer, 2009.

Turrini, A.; Sbrana, C.; Nuti, M.P.; Pietrangeli, B.M.; Giovannetti, M. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** 266: 69-75, 2004.

Unterseher, M.; Reiher, A.; Finstermeier, K.; Otto, P.; Morawetz, W. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. **Mycological Progress** 6: 201-212, 2007.

Valadares-Inglis, M.C.C.; Shiler, W.; De-Souza, M. T. **Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico**. In: Melo, I. S. de Azevedo, J. L. (Ed.). Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio ambiente, 1998.

Vazquez, R.I.; Moreno-Fierros, L.; Neri-Bazan, L.; de la Riva, G.A. Intragastric and intraperitoneal administration of *Cry1Ac* protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. **Life Sciences** 64: 1.897-1.912, 1999.

Vega, F.E.; Posada, F.; Aime, M.C.; Pava-Ripoll, M.; Infante, F.; Rehner, A.S. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control** 46: 72-82, 2008.

Villany, I.; Füzy, A.; Naár, Z.; Bakonyi, G.; Biró, B. **Rhizobiological characterization and environmental risk of transgenic Bt corn**. In: International Congress of Rhizosphere, 2004, Munich. Perspectives and Challenge... Munich: [S. n.], 2004.

Vila-Aiub, M.M.; Martínez-Ghersa, M.; Ghersa, C. Evolution of herbicide resistance in weeds: vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities. **Evolutionary Ecology** 17: 441-456, 2003.

Von Halmschlager, E.; Butin, H.; Donaubauer, E. Endophytische pilze in blättern und zweigen von *Quercus pertraea*. **European Journal of forest Pathology** 23: 51-63, 1993.

Vujanovic, V.; Brisson, J. A comparative study of endophytic mycobiota in leaves of *Acer saccharum* in eastern North America. **Mycological Progress** 2: 147-154, 2002.

Wang, B.; Priest, M.J.; Davidson, A.; Brubaker, C.L.; Woods, M.J.; Burdon, J.J. **Mycological Research** 111: 347-354, 2007.

Wang, B.; Dale, M.D.; Kochman, J.K. Studies on a pathogenicity assay for screening cotton germplasms for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the glasshouse. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 39: 967-974, 1999.

Wei, X.D.; Zou, H.L.; Chu, L.M.; Liao, C.M.; Lan, C.Y. Field released transgenic papaya affects microbial communities and enzyme activities in soil. **Plant and Soil** 285: 347-358, 2006.

Williamson, M. Environmental risks from released of genetically modified organisms (GMOs)-the need for molecular ecology. **Molecular Ecology** 1: 3-8, 1992.

White, J.F.; Cole, G.T. 1985. Endophyte-host associations in forage grasses. II. Taxonomic observations on the endophyte of *festuca arundinacea*. **Mycologia** 77: 483-486, 1985.

White, J.F. Endophyte-host associations in grasses. XIX. A systematic study of some sympatric species of *Epichloë* in England. **Mycologia** 85: 444-455, 1993.

White, J.F.; Reddy, P.V.; Bacon, C.W. **Biotrophic endophytes of grasses: a systemic appraisal**. In: Bacon, C. W.; White, J. F. (Ed.). Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker, 2000.

Zhang, J.; Howell, C.R.; Starr, J.L.; Wheeler, M.H. Frequency of isolation and the pathogenicity of *Fusarium* species associated with roots of healthy cotton seedlings. **Mycological Research** 100: 747-752, 1996.

Zhang, B.; Salituro, G.; Szalkowski, D.; Li, Z.; Zhang, Y.; Royo, L.; Vilela, D.; Dez, M.; Pelaez, F.; Ruby, C.; Kendall, R.L.; Mao, X.; Griffin, P.; Calaycay, J.; Zierath, J.R.;

Heck, J.V.; Smith, R.G.; Moller, D.E. Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science** 284: 974-981, 1999.

Zhang, Y.; Mu, J.; Feng, Y.; Kang, Y.; Zhang, J.; Gu, P.J.; Wang, Y.; (...), Zhu, Y.H. Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy. **Marine Drugs** 7: 97-112, 2009.

Zhao, J.Z.; Li, Y.X.; Collins, H.L.; Cao, J.; Earle, E.D.; Shelton, A.M. Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to *Bacillus thuringiensis* toxin *crylC*. **Journal of Economic Entomology** 94:1547-1552, 2001.

Zou, W.X.; Meng, J.C.; Lu, H.; Chen, G.X.; Shi, G.X.; Zhang, T.Y.; Tan, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products** 63: 1529-1530, 2000.

Wagenaar, M.; Corwin, J.; Strobel, G.A.; Clardy, J. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungi in the genus *Rhinochlaena*. **Journal of Natural Products** 63: 1692-1695, 2000.

Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Panphut, W.; Thongon, N.; Danwisetkanjana, K.; Ruangrunsi, N.; Meevootisom, V. Endophytic fungi with antimicrobial, anticancer, anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 20: 265–272, 2004.

Yandry, R.R.J.; Fernandez, E.D.; Rodolfi, M.; Solveig, Tosi. Actividad antagonica de hongos endofitos de plantas medicinales Del ecuador sobre bacterias patogenas. **Boletín Micológico** 21: 49-53, 2006.