UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE DIVERSIDADE ENDOFÍTICA EM PLANTAS DE SOJA (*Glycine max*) SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DE ELEVADOS CO₂ ATMOSFÉRICO E TEMPERATURA.

INCIPIT VITA NOV/

ORIENTADO: Huberman Valadares Gonçalves ORIENTADOR: Prof. Dr. Geraldo Wilson Afonso Fernandes COORIENTADORES: Dra. Yumi Oki

Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

**BELO HORIZONTE** 

Janeiro - 2016

#### HUBERMAN VALADARES GONÇALVES

# AVALIAÇÃO DE DIVERSIDADE ENDOFÍTICA EM PLANTAS DE SOJA (*Glycine max*) SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DE ELEVADOS CO₂ ATMOSFÉRICO E TEMPERATURA.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Geraldo Wilson Fernandes** COORIENTADORES: **Dra. Yumi Oki, Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis** 

> Departamento de Biologia Geral Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais BELO HORIZONTE JANEIRO - 2016

043

Gonçalves, Huberman Valadares.

Avaliação de diversidade endofítica em plantas de soja (*Glycine max*) submetidas a condições de elevados co2 atmosférico e temperatura [manuscrito] / Huberman Valadares Gonçalves. – 2016.

73 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Wilson Fernandes. Coorientadores: Dra. Yumi Oki, Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

 Genética - Teses. 2. Filogenia - Teses. 3. Fungos endofíticos - Teses. 4. Soja.
Influencia do meio ambiente. I. Fernandes, Geraldo Wilson. II. Oki, Yumi. III. Kalapothakis, Evanguedes. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 575



#### DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus orientadores, que tornaram possível o meu crescimento, de um professor Licenciado em Ciências Biológicas com praticamente nenhuma experiência prática laboratorial (e MUITA insegurança e ansiedade iniciais), a agora um Biólogo mestrando MUITO mais experiente, inteligente e seguro nas atividades laborais.

Foi verdadeiramente ENORME a diferença que senti e experimentei, e devo isto a vocês! Portanto, dedico:

Ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Wilson Fernandes, pela paciência e confiança irrestritas e por ter feito tudo ao seu alcance no apoio incondicional aos meus projetos.

À minha coorientadora Dra. Yumi Oki, pela inestimável e imprescindível ajuda, orientação, amizade, constante presença, solicitude, apoio ao longo de todo o curso e incentivo nos momentos difíceis para superação dos vários obstáculos que se fizeram presentes.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis, pela fantástica e amistosa receptividade em seu laboratório, sábia e calma orientação perante minhas ansiedades, e fundamental ajuda no meu aprendizado e formação prática laboratorial. Iniciou no auxílio ao meu projeto como colaborador, e na prática tornou-se coorientador, tamanha a ajuda, solicitude, prontidão e cooperação dedicadas.

CIÊNCIA é verdadeiramente um trabalho coletivo, e sem vocês, este trabalho não teria sido possível. Muito obrigado!!!

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e tudo o que ela tem significado, pelas oportunidades de crescimento e evolução, pelas boas energias e pelo auxílio ao longo de minha jornada. Agradeço também a todos meus mestres e mestras, humanos e espirituais, que tanto tem contribuído para o meu bem estar, superação dos desafios da vida, e apoio infinito à minha evolução, crescimento e desenvolvimento em todos os aspectos.

Agradeço à minha família pelo apoio, amor, auxílio e compreensão. Agradeço ao meu pai José Ruy e à minha mãe Marilúcia por tudo o que fizeram por mim, sempre me auxiliando e buscando o melhor pra minha vida e pro meu desenvolvimento. Agradeço ao meu irmão Alexander pelo amor fraterno ao longo de toda a jornada da vida e pela boa influência que me ajudou a me tornar quem eu sou hoje. E agradeço à minha madrasta Edith pela bondade, fraternidade e amor com os quais passou a partilhar com toda a família.

Agradeço novamente ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Wilson Fernandes e aos meus coorientadores Dra. Yumi Oki e Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis, que me forneceram as oportunidades e tudo o mais necessário ao meu aprendizado (principalmente prático) nestes dois anos de mestrado, permitindo-me não apenas preencher a lacuna de minha inexperiência laboratorial e científica, mas também ajudando a me aprimorar mais como ser humano, vencendo limitações, superando defeitos e triunfando perante os obstáculos, sempre presentes na vida.

Agradeço a todos da coordenação do Programa de Pós-Graduação de Genética (à Coordenadora Profa. Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard, aos subcoordenadores Prof. Dr. Anderson Miyoshi, Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis e às secretárias Mary das Graças Santos e Enaile Dias Siffert) pelo constante apoio, tanto às minhas demandas pessoais, quanto ao apoio e dedicação a todo o corpo discente de pós-graduandos da Genética.

Agradeço aos colegas de LEEB (Laboratório de Ecologia Evolutiva e Biodiversidade) pela amizade e apoio, à Cecília, Eduardo e Lucas, pelas importantes ajudas recebidas; e faço um agradecimento especial à doutoranda Leandra Bordignon, por me fornecer o material biológico e as bases para um novo projeto que, em verdade, salvou o meu mestrado, depois de eu ter necessitado passar por duas mudanças de projeto ao longo do curso.

Agradeço aos colegas de LBMM (Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares) pelo ambiente amistoso e acolhedor, em especial a Nazaré, Maísa, Ana Paula, Flávia, Anderson, Pedro, Bárbara, Luísa Terenzi e Hortênsia; pela ajuda e apoio constantes recebidos ao longo de minhas atividades práticas.

Agradeço ao pessoal do LBEM (Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular), em especial ao Prof. Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos e aos colegas José Eustáquio, Davidson e Eloisa, pela gentileza, solicitude e imprescindível ajuda na realização dos sequenciamentos de Sanger.

Agradeço às colegas do Laboratório de Sistemática de Biomoléculas de Fungos: Mariana, Ana Raquel e Lívia, pela gentileza com o qual fui recebido e pela solidariedade oferecida na ajuda em suas especialidades.

Agradeço aos grandes profissionais psicólogos Juliana Aragão Grassi Marques e (ao também amigo) Johann Frederico Ravnjak, que tanto me ajudaram para que eu definisse meus rumos com mais clareza, foco e determinação.

Agradeço a todos os amigos que enriquecem e engrandecem a minha vida, em especial ao Flávio Túlio, pelo constante apoio!

E encerrando, agradeço aos colegas de pós-graduação pela companhia durante esta fantástica jornada, e à CAPES, pelo imprescindível apoio financeiro.

# ÍNDICE

ÍNDICE	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Mudanças climáticas e impacto ambiental do CO <sub>2</sub>	18
1.2 Fungos endofíticos	19
1.3 Soja e fungos endofíticos	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Plantas de soja e fungos endofíticos	25
3.2 Amostragem do material fúngico	27
3.3 Avaliações de genes para identificação de fungos endofíticos	30
3.4 Extrações de DNA	32
3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase)	33
3.6 Eletroforeses em gel de agarose	
3.7 Clonagem	
3.8 Sequenciamento	37
3.9 Análises de dados moleculares	38

. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Resultados de extrações de DNA, amplificações (PCR) e clonagem	
4.2 Identificações moleculares da micota endofítica	
4.3 Análise dos dados moleculares e filogenéticos	50
4.4 Relação dos tratamentos de CO2 e a comunidade da micota endofítica	58
. CONCLUSÕES	62
. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
. ANEXOS	
7.1. Sequências dos fungos endofíticos isolados	

# LISTA DE FIGURAS

Figura 2: Morfotaxons de fungos endofíticos obtidos de soja (G. max vB760S) ...... 26

Figura 8: Duas eletroforeses em gel de agarose 0,7% com resultados de extrações de DNA dos fungos endofíticos de soja (Amostras 04, 05, 08, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 21 e 31B) ...... 43

Figura 14: Árvore filogenética demonstrando as proximidades dos isolados FESMT31AC494PB, FESMT31BC469PB, FESMT34R474PB e FESMT39R478PB em relação às respectivas espécies retornadas nas buscas com o BLAST (GenBank/NCBI) .... 53

# LISTA DE TABELAS

Tabela 4: Critérios de classificação sistemática dos FES, segundo Godinho et al. (2013) &Ferreira et al. (2015)41

Tabela 6: Resumo das ocorrências dos morfotaxons identificados molecularmente e gênerosem função dos tratamentos58

Tabela 7: Similaridade de morfotaxons dos fungos endofíticos molecularmente identificadosentre os quatro tratamentos de cultivo da soja59

# LISTA DE ABREVIATURAS

- °C = Grau(s) Celsius
- AC/AT = Alto CO<sub>2</sub> / Alta Temperatura
- $AC/TA = Alto CO_2 / Temperatura Ambiente$
- CA/AT = CO<sub>2</sub> Ambiente / Alta Temperatura
- $CA/TA = CO_2$  Ambiente / Temperatura Ambiente
- C = Carbono
- N = Nitrogênio
- C:N = Razão carbono por nitrogênio
- CO<sub>2</sub> = Dióxido de carbono
- BDA = Batata-Dextrose-Agar
- SOC = Super Optimal broth with Catabolite repression
- HI-DI = Highly Deionized
- DNA = Ácido Desoxirribonucleico
- RNA = Ácido Ribonucleico
- rRNA = RNA ribossomal
- ITS = Internal Transcribed Spacer
- NS = Nuclear, small
- MS = Mitochondrial, small
- ML = Mitochondrial, large
- G. max = Glycine max
- G. max vB760S = Glycine max, variedade BRS-MG 760S EMBRAPA Soja
- FES = Fungo(s) Endofítico(s) de Soja (*Glycine max*)

- pb = Pares de base
- GtC = Giga tonelada de carbono
- ppm = Partes por milhão
- rpm = Rotações por minuto
- g = Força g
- BOD = Biochemical Oxygen Demand
- Tris = Trishidroximetilaminometano
- HCI = Ácido clorídrico
- EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético
- TE = Tris-HCL EDTA
- NaCL = Cloreto de sódio
- SDS = Dodecil sulfato de sódio
- NaOH = Hidróxido de sódio
- CTAB = Brometo de cetiltrimetilamônio
- TBE = Tris-base, ácido bórico, EDTA
- pH = Potencial Hidrogeniônico
- UV = Ultravioleta
- kV = Kilovolt
- TEF1- $\alpha$  = Translation Elongation Factor 1- $\alpha$
- rpb2 = RNA polimerase sub-unidade B2
- DNTP = Didesóxirribonucleotídeos tri-fosfato
- Taq = Thermus aquaticus
- M = Molar
- ng = Nanograma

pmol = Picomol

- mL = Mililitro(s)
- $\mu$ I = Microlitro(s)
- U = Unidades
- MT = Morfotaxon(s)
- Taxid = *Taxonomy identity*
- NJ = Neighbor-Joining
- PA = Para Análise
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- BLAST = Basic Local Alignment Search Tool
- CONAB = Companhia Nacional de Abastecimento
- EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- IPCC = Intergovernmental Panel on Climate Change
- NASA = National Aeronautics and Space Administration
- NCBI = National Center for Biotechnology Information
- USDA = United States Department of Agriculture

#### RESUMO

Entre as grandes mudanças ambientais do planeta confirmadas pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC 2014) está o aumento desenfreado da concentração de dióxido de carbono (CO2) na atmosfera e a concomitante elevação da temperatura global, e estas terão implicações substanciais no desenvolvimento vegetal e nas relações com os fungos endofíticos associados. Neste estudo avaliamos a composição de fungos endofíticos de uma das mais importantes cultivares de interesse agrícola mundial, a soja (Glycine max), através do uso de técnicas biomoleculares para a identificação dos gêneros de parte da micota endofítica isolada. Plantas de soja modificada (Glycine max, variedade BRS-MG 760S EMBRAPA) foram submetidas a diferentes tratamentos com simulação de elevadas concentrações de CO2 atmosférico e temperatura. De uma amostragem cedida de 22 morfotaxons de fungos endofíticos, 14 foram identificados neste estudo, com base no sequenciamento das regiões ITS de sub-unidades de rRNA. Os táxons identificados foram: Aspergillus sp., Candida sp., Chaetomium sp., Colletotrichum sp., Preussia sp., Pseudocercospora sp. e Xylareaceae sp.. A análise filogenética realizada para os fungos dos táxons citados identificou uma tendência de separação por tratamento das plantas de soja. As altas concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico e temperatura modificaram substancialmente a composição da micota endofítica das plantas de soja, e os resultados sugerem a ocorrência de substituições de espécies em consequência a estas mudanças ambientais. Tais modificações podem implicar em sérias alterações do perfil metabólico e fisiológico da planta hospedeira, acarretando impactos ambientais e ecológicos imprevisíveis nos mais diversificados níveis.

#### ABSTRACT

Among the great environmental changes of the planet confirmed by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC 2014) are the uncontrolled enhancements of the carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) on the atmosphere and the concomitant global temperature raise, and these will have substantial implications on the vegetable development and between the relations with their associated endophytic fungi. In this study we evaluate the endophytic fungi composition from one of the major world crops of agricultural interest, soybean (Glycine max), through the use of biomolecular techniques to identify part of the genera isolated from the endophytic mycota. Modified soy plants (Glycine max, BRS-MG 760S EMBRAPA variety) were submitted to different treatments simulating both elevated CO<sub>2</sub> atmospheric concentration and temperature. From a provided sampling of 22 morfotaxons of endophytic fungi, 14 were identified in this study, based on the sequencing of the rRNA subunits ITS regions. The identified taxons were: Aspergillus sp., Candida sp., Chaetomium sp., Colletotrichum sp., Preussia sp., Pseudocercospora sp. and Xylareaceae sp.. The phylogenetic analyses performed to the fungi of cited taxons identified a split tendency by soy plants treatment. The high atmospheric CO<sub>2</sub> and temperature substantially modified the soy plants endophytic mycota, and the results suggest the occurrence of species substitutions as consequences to these environmental changes. Such modifications may imply in serious host plant physiologic and metabolic profile changes, leading to unpredictable environmental and ecological impacts in the most diverse levels.

# 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Mudanças climáticas e impacto ambiental do CO<sub>2</sub>

Dentre as grandes mudanças ambientais do planeta confirmadas pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC 2014) está o aumento desenfreado da concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na atmosfera. Nestes últimos dois séculos, o uso crescente de combustíveis fósseis e a derrubada de florestas levaram a um aumento crescente das concentrações de CO2 na atmosfera, e a expectativa é que continue aumentando numa taxa de 1,9 a 2,1 partes por milhão (ppm) por ano, sendo a queima dos combustíveis fósseis responsável por cerca de 80% e o desmatamento pelos outros 20% (Stocker et al. 2013). No período pré-industrial (ano ~1750) haviam 278 ppm de CO<sub>2</sub> na atmosfera, atingindo atualmente a alarmante concentração de 390 a 400 ppm (Stocker et al. 2013; NASA 2013). Isto representa um aumento de 44% em um curto período geológico e evolutivo (Coviella & Trumble 1999). Neste alarmante cenário, a perspectiva é que estes valores atinjam 560 ppm ainda neste século (Dukes 2000), o que representa o dobro da era pré-industrial. Análises de bolhas de CO<sub>2</sub> aprisionadas em amostras de gelo profundo nas calotas polares indicam que as concentrações atuais excedem as concentrações de 800.000 anos atrás (180 - 300 ppm) (NASA 2013). As emissões anuais de CO<sub>2</sub> oriundas da queima de combustíveis fósseis aumentaram de uma média de 6,4 GtC (giga tonelada de carbono) na década de 90 para 8,3 GtC por ano entre 2002 e 2011 (Stocker et al. 2013).

Muitos estudos têm investigado como os efeitos do aumento do  $CO_2$  afetam indiretamente os organismos associados como insetos e microrganismos, através de modificações na fisiologia, bioquímica e morfologia de suas plantas hospedeiras (Lincoln, Fajer & Johnson 1993; Watt et al. 1995; Bezemer & Jones 1998; Hunter 2001; Whittaker & Cairney 2001; Blagodatskaya et al. 2010; Compant, van der Heijden & Sessitsch 2010). Plantas que crescem em ambientes enriquecidos de  $CO_2$  tendem a apresentar aumento da atividade fotossintética, aumento da produtividade primária e secundária, e aumento da área foliar e /ou biomassa aérea e de raízes (Hughes & Bazzaz 1997; Owensby et al. 1999). O enriquecimento de  $CO_2$  também afeta o metabolismo primário e secundário das plantas, ao elevar a disponibilidade de carbono e impactar na mudança da razão C:N atmosférico, afetando diretamente o nível de nitrogênio foliar e causando o chamado "efeito da diluição do nitrogênio". Bezemer & Jones (1998) revisaram os efeitos do enriquecimento de  $CO_2$  em 38 estudos e demonstraram que a quantidade de nitrogênio diminui em aproximadamente

15% em tratamentos de  $CO_2$  elevado. Stiling & Cornelissen (2007), revisando metaanaliticamente os efeitos do enriquecimento com  $CO_2$  em 75 estudos entre 1984 e 2003, demonstraram uma redução de 16,4% no nitrogênio foliar, aumento de 38,4% na biomassa foliar, e aumento de 29,9% na concentração de taninos e outros compostos fenólicos em plantas crescendo em tratamentos de  $CO_2$  elevado, comparadas a plantas crescendo em condições controle.

Embora nesta última década os estudos das respostas dos ecossistemas às mudanças climáticas globais tenham crescido substancialmente, no Brasil ainda são poucos os projetos nesta área. Maiores investigações sobre o efeito do enriquecimento de CO<sub>2</sub> no desenvolvimento, metabolismo primário e secundário e interações com níveis tróficos se fazem necessárias para predizer e auxiliar nas medidas para minimizar os futuros impactos de mudanças climáticas globais. Ainda neste âmbito, torna-se imprescindível a busca de resultados que permitirão compreender a magnitude das mudanças climáticas globais no desenvolvimento e nos aspectos nutricionais de cultivares de amplo consumo humano, bem como os seus possíveis reflexos nas relações tróficas (como com a micota endofítica associada) e no ecossistema como um todo.

## 1.2 Fungos endofíticos

Interações entre as plantas e microrganismos são bastante conhecidas, mas com exceção da associação de plantas com fungos micorrízicos, acreditava-se que estas interações normalmente levavam à formação de lesões nos tecidos vegetais. Sabe-se hoje que diversos microrganismos têm interações comensais e/ou benéficas com suas plantas hospedeiras, como no caso dos fungos endofíticos (colonizadores do interior das plantas). Os fungos endófitos são considerados como componente ubíquo e importante da diversidade de fungos (estimada em 1,5 milhão de espécies, Hawksworth 2001), embora o conhecimento sobre a escala de sua diversidade, variedade de hospedeiros e distribuição geográfica não seja ainda clara. Apesar dos fungos endofíticos estarem distribuídos em todas as espécies vegetais, por muitos anos a maioria das investigações publicadas esteve concentrada principalmente sobre as espécies vegetais nativas da região temperada, ou em alguns restritos cultivares de importância econômica (Saikkonen et al. 1998; Arnold & Herre 2003; O'Brien, Parrent & Jackson 2005; Arnold et al. 2009).

A falta de conhecimento de grande parte da diversidade de fungos endofíticos se deve à dificuldade de identificar os mesmos pela clássica taxonomia, baseada nos aspectos

macro (textura, pigmentação geral e das bordas, relevo) e microscópicos (esporos). A grande maioria dos fungos endofíticos não esporula em meios de cultivo, requerendo sua identificação por meio de técnicas moleculares (U'Ren et al. 2009).

Com o crescente aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, é inegável não atentarmos para as possíveis mudanças na diversidade endofítica. Mudanças fisiológicas e estruturais que ocorrem nas plantas com o aumento das concentrações de CO<sub>2</sub> poderão ter efeitos significativos sobre os padrões de desenvolvimento, abundância e sobrevivência de microrganismos endofíticos, sendo ainda raras as informações sobre os efeitos do aumento do CO<sub>2</sub> na diversidade endofítica. Estudos de Rillig, Field & Allen (1999) têm demonstrado uma redução na riqueza e abundância de fungos endofíticos de raízes e fungos patogênicos foliares em condições de CO<sub>2</sub> elevado, devido à mudanças no metabolismo primário e secundário e disponibilidade de recursos. Compant, van der Heijden & Sessitsch (2010) apresentaram dados de estudos demonstrando efeitos variados (positivos, neutros e negativos) da elevação das concentrações de CO<sub>2</sub> nas relações das plantas com seus fungos endofíticos: *Neotyphodium coenophialum* aumentou sua colonização no hospedeiro fetusca alta (*Schedonorus Phoenix*); *Acremonium Iolii* não alterou sua interação com a grama hospedeira *Lolium perenne*, porém, esta teve sua relação simbiótica com o fungo *Neotyphodium Iolii* alterada, levando a um aumento de conteúdo de carboidratos totais.

Importantes características a serem consideradas são a presença ou ausência, dominância e prevalência dos fungos endofíticos nas plantas. Em experimentos com endofíticos de uma determinada planta, Larran et al. (2002) isolaram 16 espécies diferentes de fungos endofíticos e obtiveram como resultados as discrepantes frequências de colonização da espécie *Alternaria alternata* em 70%, *Glomerella cingulata* em 15% (percentuais aproximados) e as demais espécies variando de 0,4% a 5,5% de prevalência; demonstrando que um grande número de espécies de fungos podem ser isolados de um determinado hospedeiro, mas apenas algumas poucas espécies podem estar presentes em quantidades significativas, constituindo-se em espécies dominantes.

A análise de dados destas relações de ocorrência, dominância e prevalência permite utilizar os fungos endofíticos como bioindicadores sensíveis dos impactos das mudanças climáticas e do estado de conservação de sistemas manejados, sendo por isto importante conhecer detalhadamente as espécies envolvidas, suas sistemáticas e filogenias. Fungos endofíticos e seus metabólitos secundários podem conferir benefícios variados a diversas plantas, dentre eles: aumento do *fitness* biológico, proteção contra herbivoria de insetos e animais, resistência a patógenos e doenças, aumento da biomassa caulinar e radicular; tolerância a fatores abióticos como seca, calor, salinidade, e outros tipos de estresse (Omacini et al. 2001; Rodriguez et al. 2009).

Como benefícios adicionais da pesquisa e conhecimento acerca do assunto, estudos apontam que fungos endofíticos produzem enzimas, hormônios e metabólitos secundários de interesse econômico e medicinal (Johnson et al. 2007). A droga anticancerígena conhecida como Taxol® (Paclitaxel) pode ser produzida por fungos endofíticos de plantas do gênero *Taxus* e esta substância na planta age como inibidor de fungos patogênicos (Soliman et at. 2013). Esta droga anticancerígena é a mais vendida mundialmente, com vendas anuais no volume de US\$3,7 bilhões de dólares no mercado internacional (Articles Factory 2012). Outros produtos biológicos, como o peptídeo antimicótico criptocandina, os compostos anti-virais Ácidos Cetônicos A e B, os anti-oxidantes Pestacina e Isopestacina, o agente antidiabético L-783,281 e o imunossupressor Subglutinol A são todas substâncias produzidas por fungos endofíticos de variadas plantas hospedeiras (Strobel & Daisy 2003), demonstrando um enorme potencial de exploração científica, medicinal e econômica.

Considerando a importância biológica, aplicações e potencialidades, é inegável a relevância sobre o conhecimento metabólico, ecológico e genético de espécies de fungos endofíticos, o que fornece um infindável rol de possibilidades de explorações acadêmicas, científicas, industriais e tantas outras em áreas diversificadas (Bascom-Slack, Arnold & Strobel 2012). E dentro deste contexto, torna-se fundamental elucidar os impactos que o aumento de CO<sub>2</sub> (com consequente aumento da temperatura) poderá causar tanto na diversidade, quanto na abundância dos fungos endofíticos que habitam as espécies vegetais dos ecossistemas.

No Brasil, Oki et al. (dados não publicados) observaram que algumas modificações estruturais, nutricionais e químicas observadas em *Baccharis dracunculifolia* (com aumento da concentração do CO<sub>2</sub> atmosférico) são suficientes para alterar substancialmente a composição de espécies endofíticas. Cerca de 50% das espécies encontradas em tratamento CO<sub>2</sub> ambiente (360 ppm) não foram observadas nos tratamentos com aumento da concentração de CO<sub>2</sub> (720 ppm). Os pesquisadores notaram que algumas espécies endofíticas com potencial de minimizar a infecção de patógenos não puderam ser encontradas no tratamento com o dobro de CO<sub>2</sub>. Juntamente com modificações pronunciadas na micota endofítica, processos estão sendo alterados sem nos darmos conta da real magnitude destes, e poderão ter consequências na sobrevivência de plantas e na estrutura das comunidades vegetais. Um impacto em plantas alimentícias das quais dependemos para sobreviver tende a ser extremamente negativo e preocupante neste cenário.

Algumas espécies de fungos endofíticos atenuam os efeitos diretos do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e das altas temperaturas e secas prolongadas. Newman et al. (2003), por exemplo, inferiu que a presença de um fungo endofítico em Festuca arundinaceae (ervacarneira) altera a composição química da planta hospedeira, aumentando a quantidade de nitrogênio, e desta maneira minimizando os efeitos negativos observados da diluição do nitrogênio e do aumento da razão C:N. Investigações demonstraram que a introdução de esporos de fungos endofíticos em cultivares possibilita uma maior resistência às altas temperaturas e baixa umidade (Pennisi 2003). Redman et al. (2002) observaram que somente as gramíneas com endofíticos sobreviveram em solos mais quentes (65°C). Em cultivares, como tomate e pimenta, as plantas inoculadas com fungos conseguem sobreviver à dessecação por 24 horas (para tomate) e 48 horas (para pimenta) a mais do que as plantas sem endofíticos (Redman, Dunigan & Rodriguez 2001). Endofíticos também beneficiam a planta contra a invasão de patógenos. Rodriguez, Redman & Henson (2004) mostraram que plantas simbióticas apresentam uma resposta defensiva dentro de 24 horas e sem estes fungos, as plantas precisam de três dias (tempo suficiente para que os patógenos colonizem com sucesso a planta hospedeira). A simbiose com os fungos elevou a habilidade das plantas em perceber os patógenos e rapidamente ativar, em altos níveis, sistemas defensivos como atividade de peroxidase e deposição de lignina.

#### 1.3 Soja e fungos endofíticos

Os endofíticos podem ter participação crucial na sobrevivência das comunidades vegetais em condições de alto estresse ambiental decorrente das contínuas mudanças climáticas, como o aquecimento global (Rodriguez, Redman & Henson 2004). Cada vez mais, as pesquisas evidenciam que as interações entre fungos e plantas apresentam uma grande importância biológica e econômica (Omacini et al. 2001; Rudgers, Koslow & Clay 2004). Este é um campo inteiramente aberto para novas descobertas e promissor especialmente para os cultivares de grande relevância econômica para o país, como a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (CONAB 2010).

O Brasil é considerado o segundo maior exportador mundial de soja, de acordo com o 12º levantamento para a safra mundial de soja do Departamento de Agricultura norteamericano (USDA) 2014/2015 e segundo o relatório "USDA Baseline Trade Projections" (Westcott 2012), o Brasil será o maior exportador de soja do mundo na próxima década, tendo esta rendido ao país cerca de US\$ 17,1 bilhões de dólares em exportações no ano de 2010 (EMBRAPA 2010). A soja é uma leguminosa que possui sementes proteicas com elevado teor de óleo, sendo capaz de fixar nitrogênio atmosférico pela simbiose com microrganismos. Muito usada na alimentação humana e animal, a soja é uma das mais importantes oleaginosas cultivadas no mundo, sendo de extrema importância econômica e agrícola.

Ainsworth et al. (2002), reuniu dados sobre o impacto de elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> na fisiologia, crescimento e rendimento da soja, demonstrando que diversos parâmetros são diferentemente afetados pela alta concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico (média de 690 ppm), como o aumento da taxa fotossintética foliar (em 39%), assimilação do dossel (em 59%), área total foliar (em 18%), número de favas (em 19%, com consequente aumento do rendimento de sementes em 24%) e biomassa geral (em 37%). Também foram registrados aumentos nas concentrações de sacarose foliar, carboidratos não estruturais totais, amido, peso seco de caule e raiz. No entanto, diminuíram a condutância estomatal, atividade total da enzima Rubisco (em 11%), conteúdo de Rubisco por área foliar (em 10%) e índice de colheita (fração de grãos em relação à matéria seca total da planta). A concentração de nitrogênio também tendeu a diminuir em plantas não fixadoras (em 16% do nitrogênio foliar com relação a grupos controle), mas não necessariamente em plantas bem fertilizadas, o que indica uma possibilidade de certa remediação através de técnicas agrícolas, como o uso de fertilizantes e/ou inoculação de bactérias fixadoras, dentre outras.

No entanto, ainda resta compreender melhor e com mais informações os efeitos das concentrações de CO<sub>2</sub> e temperatura na composição e diversidade de fungos endofíticos na soja, o que demanda, inicialmente, conhecer as espécies que colonizam endofiticamente a planta em questão. Considerando a relevância da soja para a economia do país, torna-se imprescindível conhecer as respostas aos possíveis impactos do aumento de CO<sub>2</sub> previsto para as próximas décadas sobre este cultivar, e especialmente sobre seus fungos endofíticos colonizadores, que poderão atenuar seus efeitos e auxiliar na sua sobrevivência. A identificação destes fungos endofíticos (por vias clássicas e moleculares) juntamente com o levantamento de conhecimentos relevantes a eles relacionados (como uma análise filogenética objetivando inferir informações relacionadas a diferentes condições ambientais) permitirão o aproveitamento dos potenciais remediadores, preventivos e tecnológicos disponíveis, o que gera uma enorme gama de possibilidades de aplicações e benefícios científicos, econômicos, agrícolas e demais variados nas atividades que englobam estes organismos mutualisticamente relacionados.

# 2. OBJETIVOS

Considerando a relevância de compreender os efeitos das elevações das concentrações de CO<sub>2</sub> e temperatura na composição e diversidade de fungos endofíticos na soja, um dos cultivares mais importantes economicamente para o país, os objetivos deste trabalho foram:

## A) OBJETIVOS GERAIS:

Identificar molecularmente os táxons de 22 amostras de fungos endofíticos isolados de plantas de soja submetidas a diferentes tratamentos com variação na concentração de CO<sub>2</sub> e temperatura.

## B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Analisar a composição de fungos endofíticos de cada tratamento das plantas de soja submetidas a diferentes variações na concentração de  $CO_2$  e de temperatura; 2. estabelecer relações filogenéticas entre os fungos endofíticos identificados, visando obter possíveis informações relevantes com a inclusão de dados dos diferentes tratamentos; 3. analisar a relação da composição da comunidade endofítica e efeitos do aumento de  $CO_2$  e temperatura.

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Plantas de soja e fungos endofíticos

No Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, desde 2013 um trabalho sobre os efeitos do  $CO_2$  e da temperatura nas interações biológicas da soja, com plantas oriundas de sementes certificadas pela EMBRAPA (variedade BRS-MG 760S, uma cultivar transgênica com tolerância ao herbicida glifosato) vem sendo desenvolvido pela doutoranda (em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) Leandra Bordignon, orientada pelo Prof. Dr. Geraldo Wilson Fernandes. Estas plantas foram inoculadas com bactérias noduladoras (*Bradyrhizobium japonicum*, Semia 5079 e Semia 5080) e plantadas em quatro câmaras de topo aberto numa casa de vegetação no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em quatro tratamentos (um tratamento por câmara): câmara com injeção de ar ambiente (390 ppm  $CO_2$ ) e temperatura ambiente, câmara com injeção de ar ambiente e temperatura elevada (adição de 3 °C), câmara com injeção de adicional de  $CO_2$  (780 ± 50 ppm de  $CO_2$ ) e temperatura elevada (adição de 3 °C) (Figura 1).

As folhas de soja (*Glycine max* variedade BRS-MG 760S) destes experimentos foram coletadas após 60 dias de exposição aos tratamentos, quando já estavam desenvolvidas e iniciando o estágio reprodutivo, com o objetivo de avaliar os efeitos do aumento de  $CO_2$  e temperatura na comunidade de fungos endofíticos, nutrientes (carbono e nitrogênio) e desenvolvimento vegetal. As folhas maduras foram retiradas aleatoriamente de 12 plantas de soja de cada um dos quatro tratamentos, lavadas e esterilizadas, cortadas em partes menores e inseridas em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar). Estas placas foram incubadas e o isolamento dos fungos endofíticos resultantes foi realizado através da transferência do micélio para outras placas de BDA, com o total de colônias separado em 39 morfotaxons diferentes (Figura 2). Os fungos isolados não apresentaram estrutura reprodutiva para identificação taxonômica tradicional, se fazendo necessário o uso da identificação molecular para avaliar a composição e a diversidade da micota endofítica nos diferentes tratamentos de concentração de  $CO_2$  atmosférico e temperatura. Espera-se que os tratamentos de  $CO_2$  e temperatura influenciem na seleção das espécies de fungos endofíticos com maior relação filogenética.



Figura 1: Câmaras de topo aberto com variações de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> para o cultivo das plantas de soja (*Glycine max* variedade BRS-MG 760S). (Fonte: Lucas Barbosa Souza Tameirão 2013).



Figura 2: Morfotaxons de fungos endofíticos obtidos de soja (G. max vB760S). (Fonte: Leandra Bordignon 2013).

#### 3.2 Amostragem do material fúngico

Ao todo, foram isolados 65 fungos endofíticos de 39 morfotaxons da soja proveniente dos experimentos realizados nas camaras de CO<sub>2</sub> (Tabela 1). Algumas amostras contaminaram e foram devidamente excluídas, assim sendo, 22 amostras biológicas de isolados de fungos endofíticos de soja (FES) puderam ser disponibilizados para a identificação molecular neste trabalho. As amostras entregues foram numeradas de acordo com um determinado morfotaxon previamente identificado visual e morfologicamente (Tabela 2). Destes, 20 amostras de isolados correspondem a um morfotaxon diferente cada (ou seja, 1 morfotaxon/isolado/amostra, resultando em 20 morfotaxons), com a exceção dos morfotaxons 31 e 35, que forneceram amostras em duplicata (classificadas como 31A, 31B, 35A e 35B). Os fragmentos dos morfotaxons isolados foram colocados em tubos de 1,5 mL e encaminhados para as identificações moleculares, constituindo-se estes, os objetos e procedimentos do presente trabalho.

Tabela 1: Dados quantitativos totais do experimento de isolamento dos FES: número de colônias isoladas de cada morfotaxon (MT) por tratamento, abundância de isolados por morfotaxons (linha "Soma" na parte inferior da tabela), riqueza de morfotaxons por tratamento (dentre os 39 mt identificados, segunda coluna cinza na parte direita da tabela), somas parciais e totais (duas últimas colunas em cinza na parte direita da tabela), indicando a composição da diversidade endofítica da soja nas 4 condições de tratamento. CA/TA (CO<sub>2</sub> Ambiente / Temperatura Ambiente), CA/AT (CO<sub>2</sub> Ambiente / Alta Temperatura), AC/TA (Alto CO<sub>2</sub> / Temperatura Ambiente), AC/AT (Alto CO<sub>2</sub> / Alta Temperatura). Os 22 morfotaxons amostrados e cedidos (as amostras 31 e 35 possuem duplicatas), objetos do trabalho de identificação molecular, estão destacados em negrito e em células de cor amarelo claro. (Dados totais: Leandra Bordignon 2013. Tabela e somas dos identificados destacados: o autor).

MORFOTAXON	M T 0 1	M T 0 2	M T 0 3	М Т 0 4	M T 0 5	M T 0 6	M T 0 7	M T 0 8	M T 0 9	M T 1 0	M T 1 1	M T 1 2	M T 1 3	M T 1 4	M T 1 5	M T 1 6	M T 1 7	M T 1 8	M T 1 9	M T 2 0	M T 2 1	M T 2 2	M T 2 3	M T 2 4	M T 2 5	M T 2 6	M T 2 7	M T 2 8	M T 2 9	M T 3 0	M T 3 1	M T 3 2	M T 3 3	M T 3 4	М Т 3 5	М Т 3 6	M T 3 7	M T 3 8	M T 3 9	Total de isolados	UCINE 33 III
CA/TA	0	0	2	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	15	1
CA/AT	1	3	1	1	0	2	1	1	0	4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	1
AC/TA	1	0	0	1	0	0	2	0	1	9	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	1
AC/AT	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	5	Ę
SOMA	2	3	3	2	3	2	3	2	2	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	65	-

Tabela 2: Informações dos morfotaxons de fungos endofíticos de soja amostrados para identificação biomolecular. Os morfotaxons 31 e 35 foram amostrados em duplicata. Tratamentos: Alto  $CO_2$  e Alta Temperatura = AC/AT; Alto  $CO_2$  e Temperatura Ambiente = AC/TA;  $CO_2$  Ambiente e Alta Temperatura = CA/AT;  $CO_2$  Ambiente e Temperatura Ambiente = CA/TA. (Fonte: Leandra Bordignon e Lucas Barbosa Souza Tameirão 2013. Adaptação pelo autor).

Morfotaxons	Tratamento(s)	Cor principal	Cor Secundária	Textura	Aspecto da borda	Cor do Verso da Cultura					
01	AC/TA, CA/AT	Branco	Rosa	Aveludado	Liso	Branco / Marrom Claro					
02	CA/AT	Preto	Preto	Cotonoso	Rugoso	Preto					
03	CA/AT, CA/TA	Branco	Cinza	Aveludado	Liso	Marrom escuro / Marrom Claro					
04	CA/AT, AC/TA	Cinza	Preto	Aveludado	Liso	Marrom / Verde / Borda amarela e branca					
05	CA/TA	Preto	Cinza	Cotonoso	Rugoso	Cinza / Marrom Claro					
08	AC/AT, CA/AT	Branco	Cinza	Aveludado	Liso	Vermelho / Branco					
12	AC/TA	Marrom	Branco	Cotonoso	Liso	Branco / Manchas cinzas					
13	AC/TA	Branco	Branco	Cotonoso	Liso	Marrom Claro / Branco					
14	AC/TA	Cinza	Branco	Aveludado	Liso	Marrom / Branco					
15	AC/TA	Preto	Cinza	Aveludado	Rugoso	Preto					
17	CA/AT	Cinza	Marrom	Aveludado	Liso	Marrom escuro / Marrom Claro / Branco					
19	CA/AT	Branco	Branco	Aveludado	Liso	Marrom / Vermelho / Branco					
20	CA/AT	Amarelo	Verde	Aveludado	Liso	Marrom Claro / Amarelo					
21	CA/AT	Preto	Marrom	Aveludado	Rugoso	Preto					
25	CA/AT	Branco	Cinza	Cotonoso	Liso	Marrom / Listras pretas / Amarelo					
31	CA/TA	Branco	Cinza	Aveludado	Liso	Branco					
34	CA/TA	Branco	Rosa	Aveludado	Liso	Branco					
35	CA/TA	Marrom	Amarelo	Gelatinoso	Liso	Bege / Branco					
38	AC/AT	Branco	Branco	Cotonoso	Liso	Branco Amerelado					
39	AC/TA	Laranja	Vermelho	Gelatinoso	Liso	Vermelho / Laranja / Branco					

#### 3.3 Avaliações de genes para identificação de fungos endofíticos

Como estratégia a ser utilizada para a identificação dos fungos, optou-se por seguir as indicações dos trabalhos de White et al. (1990) e Fungaro (2000), cujas recomendações envolvem a análise de genes de RNA ribossômico nuclear e/ou mitocondrial através das técnicas de amplificação (reação em cadeia da polimerase com iniciadores, PCR) e sequenciamento de Sanger, com posterior submissão dos resultados à base de dados referencial (GenBank/NCBI) para as devidas comparações e identificações.

No intuito de checar a disponibilidade e quantidade de informações relativas a genes de fungos endofíticos disponíveis na base de dados escolhida, todos os 23 iniciadores (primers) recomendados (Tabela 3) foram submetidos à busca na base de dados GenBank/NCBI através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), limitando-se a busca exclusivamente ao organismo "fungo endofítico".

Tabela 3: Iniciadores (primers) recomendados para amplificação dos genes para a identificação de fungos. NS: Nuclear, small; ITS: Nuclear Internal Transcribed Spacer; MS: Mitochondrial, small; ML: Mitochondrial, large. Números ímpares indicam primers 5' (forward) e números pares indicam primers 3' (reverse). Todas as sequências estão escritas no sentido 5'-3'. (Tabela adaptada de White et al. 1990).

Primer	Sequência
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC
NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG
MS2	GCGGATTATCGAATTAAATAAC
ML1	GTACTTTTGCATAATGGGTCAGC
ML2	TATGTTTCGTAGAAAACCAGC
ML3	GCTGGTTTTCTACGAAACATATTTAAG
ML4	GAGGATAATTTGCCGAGTTCC
ML5	CTCGGCAAATTATCCTCATAAG
ML6	CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC
ML7	GACCCTATGCAGCTTCTACTG
ML8	TTATCCCTAGCGTAACTTTTATC

Na página de busca de sequências nucleotídicas do BLAST, a inserção do termo "fungal endophyte" (fundo endofítico) no campo "organismo" resultou na apresentação limite de vinte taxids disponíveis para consulta. Assim sendo, todos os 23 primers foram submetidos às buscas nos 20 taxids ofertados, resultando em 460 buscas, cujos resultados foram retornados indicando nomes de fungos endofíticos com sequências similares, regiões análogas às sequencias buscadas e alinhamentos entre estas.

As buscas dos primers de NS1 a NS8 resultaram em algumas dezenas a até pouco mais de uma centena de resultados; as buscas dos primers de ITS1 a ITS5 resultaram em várias centenas de resultados, enquanto as buscas dos primers MS1, MS2, ML1 a ML8 não retornaram resultados. Com isto, foi escolhido trabalhar com os primers das regiões intergênicas ITS (as que mais obtiveram resultados) para as devidas identificações.

A região ITS é uma região útil como marcador biológico, abrangendo as sequências de RNA ribossomal (rRNA). Estas têm sido utilizadas no estabelecimento de filogenia de larga abrangência de níveis taxonômicos de fungos, através da análise de um cluster gênico com os genes 18S; 5,8S e 28S (sequências de sub-unidades do RNA ribossômico), que por sua vez são separados entre si por regiões espaçadoras denominadas ITS (Internal Transcribed Spacer) (Fungaro 2000) (Figura 3). Estas regiões evoluem rapidamente e podem variar entre espécies dentro de um gênero ou entre populações (White et al. 1990).

Para a execução da PCR foram escolhidos os dois primers que apresentaram melhores resultados em testes preliminares para a amplificação total das regiões ITS (flanqueadoras da região 5,8S), sendo estes:

Primer forward: ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3')

Primer reverse: ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')

O tamanho da região compreendida entre os primers citados é de aproximadamente 700 pb (pares de base).



Figura 3: Cluster gênico dos fungos endofíticos usado para identificação. As setas indicam os sítios de anelamento dos primers ITS4 e ITS5, e suas direções indicam o sentido 5' - 3' da amplificação.

#### 3.4 Extrações de DNA

Para a extração e purificação do DNA genômico dos FES (fungos endofíticos de soja), foram testados três protocolos de extração, sendo utilizados os dois que resultaram nos melhores rendimentos (maiores quantidades extraídas de DNA). O primeiro foi o protocolo do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM), intitulado "Extração de DNA total com o Kit de Extração de DNA GTS Phoneutria Biotecnologia", disponibilizado na pasta de protocolos e procedimentos do laboratório. Este protocolo foi utilizado com o devido kit de reagentes citado para a extração do DNA genômico das amostras dos FES de morfotaxons: 03, 04, 05, 13, 14, 31A, 31B, 34, 38 e 39.

Fragmentos de micélio de fungos foram colocados em tubos de 1,5 mL, com a adição de aproximadamente três volumes da solução de coleta com aditivo A seguido de maceração, homogeneização e incubação na temperatura ambiente por 30 minutos. Estes foram centrifugados a 13.200 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos, com retirada de 50 µL de alíquota do sobrenadante de cada amostra para um novo tubo de 1,5 mL. Nestes, foram adicionados 10 µL de solução de sílica, com incubação a 55ºC em banho-maria por 20 minutos. Uma nova centrifugação a 3000 g por 5 minutos foi realizada, com descarte do sobrenadante e adição de 100 µL da solução de lavagem A, com homogeneização. Repetiuse uma nova centrifugação a 1500 g por 5 minutos, com descarte do sobrenadante e adição de 100 µL da solução de lavagem B, com homogeneização. Um novo descarte de sobrenadante foi realizado, com adição de acetona PA, com nova centrifugação a 1500 g por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o tubo com pellet foi deixado para secagem à temperatura ambiente no período de uma noite. No dia seguinte, adicionou-se 30 µL de TE (Tris-HCL - trishidroximetilaminometano e ácido clorídrico 0,01M e EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético 0,01M) para suspender o DNA, com centrifugação a 3400 g por 10 minutos para concentração da sílica no fundo do tubo e do DNA no sobrenadante.

Um segundo protocolo foi utilizado para a extração do DNA genômico das amostras dos FES de morfotaxons: 17, 19, 21 e 25, por obter melhores resultados em rendimentos de DNA genômico destas amostras do que os outros protocolos testados e utilizados. Este protocolo foi elaborado por De Hoog et al. (2005) e adaptado por Rosa et al. (2009).

Fragmentos de micélio de fungos foram colocados em tubos de 1,5 mL; com a adição de 400 µl de tampão de lise (Tris-HCL 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCL 0,1M e SDS - dodecil sulfato de sódio 1%) e incubação a - 20°C por aproximadamente 10 minutos. Seguiu-se a maceração dos fragmentos e acréscimo de 5 µl de Proteinase K 50 µg/mL.

Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 minutos a 60ºC em banho-maria. Foram adicionados então 162 µl de CTAB de Hoog (Tris 0,2M, NaCl 8,2%, EDTA 0,2M CTAB brometo de cetiltrimetilamônio 2%), seguido de homogeneização em vortex e incubação por 10 minutos a 65ºC. Em seguida foi acrescentado 570 µl da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após 10 minutos de homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos à temperatura de - 20°C. O conteúdo foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL, acrescentando-se 10% do volume de uma solução de Acetato de Sódio 3M e 50% do volume de isopropanol. O tubo foi vertido por 5 minutos para homogeneização, seguido de incubação a - 20°C por 60 minutos e procedendo-se uma nova centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão, seguindo-se a adição de 200 µl de etanol (Merck) 70% resfriado e gentil homogeneização da suspensão. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos, seguida do desprezo do sobrenadante por inversão. A amostra foi seca em temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos, para evaporação do excesso de etanol. Por fim, 50 µl de Tris-EDTA (Tris-HCL 0,01M e EDTA 0,01M) foram adicionados e o tubo foi incubado a 65°C por 60 minutos, para suspensão e hidratação do DNA.

#### 3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica de PCR foi usada para amplificação das citadas regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) presentes no DNA genômico dos FES para produção dos amplicons de tamanho estimado em 700 pb (pares de base) cada. As reações de PCR foram realizadas em tubos de 0,2 mL, sendo adicionados a cada tubo 2,5 µl de tampão 1C 10x Phoneutria; 0,5 µl de DNTP mix [0,04 µl/µl]; 0,2 µl de Taq polimerase 5U/µl; 1 µl de primer forward ITS5 mais 1 µl de primer reverse ITS4 (ambos na concentração de 5 pmol/µl), 2 µl de DNA genômico extraídos de FES e 17,8 µl de água ultra-pura, totalizando 25 µl. As reações de PCR foram realizadas em Termocicladores Applied Biosystems, nas seguintes condições: 3 minutos na temperatura de 95°C para desnaturação inicial das fitas de DNA; 30 segundos na temperatura de 95°C para anelamento dos primers; 2 minutos na temperatura de 72°C para extensão com a Taq polimerase; 40 ciclos de repetição e decréscimo gradual da temperatura até 4°C para finalização.

#### 3.6 Eletroforeses em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas tanto para análise do DNA genômico após a extração quanto para a análise do resultado da PCR das regiões de interesse (a fim de averiguar o sucesso das etapas). Para a análise da extração de DNA genômico foi utilizado gel de agarose na concentração de 0,7%, enquanto que para a análise de amplicons da PCR, foram usadas as concentrações de 1,5% e 2% de agarose por gel.

A agarose foi previamente dissolvida em forno micro-ondas, dosada em 50, 100 ou 200 mL (dependendo da quantidade de canaletas desejadas), misturada a Brometo de Etídio na concentração de 0,01 µl/mL de gel de agarose e solidificada em moldes com pentes para confecção das canaletas. Foi padronizada a aplicação do volume de 8 µl da mistura dos reagentes nas canaletas do gel, com as seguintes proporções: 1 µl de marcador de peso molecular, 1 µl de tampão corante e 6 µl de água ultra pura na primeira canaleta, para exibição das bandas de peso molecular. Para análise de DNA genômico foram usados 1 µl de tampão corante, 2 a 4 µl de amostra de DNA e 3 a 5 µl de água ultra-pura. Para análise de amplicons de PCR foram usados 1 µl de tampão corante, 4 a 7 µl de amostra de DNA e 0 a 3 µl de água ultra-pura. Também foram incluídos controle negativo (8 µl de água ultrapura) e controle positivo (8 µl de preparação com DNA previamente conhecido), cada qual em uma canaleta no gel de cada eletroforese.

As eletroforeses foram realizadas numa cubeta eletroforética preenchida com tampão TBE (Tris-base, ácido bórico, EDTA) ligada a uma fonte ajustada para os parâmetros de 100 volts, 100 amperes e 100 watts. Sucedidas as corridas, os géis foram colocados no transiluminador com luz UV (ultravioleta) e câmera fotográfica acoplada a computador, para detecção do DNA com marcadores moleculares de peso e fotografia do gel.

## 3.7 Clonagem

Devido ao aparecimento de bandas de produtos inespecíficos na PCR da amostra 17 de FES, foi utilizada a técnica de clonagem com vetor em bactéria para o isolamento e purificação da banda de interesse e possível investigação acerca do produto inespecífico.

Para tal, foi utilizado o kit de clonagem da Invitrogen (Life Technologies), com vetor pCR<sup>™</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> TA, seguindo-se o protocolo do manual (Figura 4).



Figura 4: Mapa do vetor pCR<sup>™</sup> 2.1-TOPO® TA com sítios de restrição, de anelamento de primers, de inserção de amplicon, sítio promotor, origens e genes componentes.

As reações de clonagem foram montadas da seguinte forma: 4 tubos de 0,2 mL foram preenchidos com alíquotas de água ultra pura em escala decrescente, de 3 a 0 µl, cada qual em um tubo. Em seguinda, alíquotas do produto de PCR da amostra 17 de FES foram adicionadas aos tubos em escala decrescente, de 1 a 4 µl. Em seguida, foram adicionados 1 µl de sal em solução (kit) e 1 µl do vetor (kit) em cada tubo, de modo que cada um destes totalizasse 6 µl de conteúdo. Seguiu-se a homogeneização do conteúdo dos tubos com pipeta e incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 12 µl de reagente para precipitação de DNA (Phoneutria) em cada tubo; todos os conteúdos dos tubos de 0,2 mL foram reunidos em um único tubo de 1,5 mL; seguido da

lavagem de cada um dos tubos de 0,2 mL com 10 μl do reagente para precipitação de DNA. O conteúdo destas lavagens foi reunido no tubo de 1,5 mL junto com a prévia solução e os tubos com os vetores foram armazenados na temperatura de - 20°C.

Cubetas para eletroporação foram selecionadas e testadas com 100  $\mu$ l de glicerol 10% em aparelho eletroporador ajustado com os parâmetros de 1,8 Kv para cubeta de 0,1 cm e 2,5 Kv para cubeta de 0,2 cm. Os vetores clonados foram precipitados com centrifugação a 13.200 rpm por 15 minutos, seguido de lavagem com 200  $\mu$ l de etanol 70% e secagem em temperatura ambiente por 30 minutos. As paredes dos tubos foram lavadas com 10  $\mu$ l de água ultrapura por 10 minutos e ao final, os tubos foram colocados em recipiente com gelo.

Bactérias eletrocompetentes XL1-Blue Phoneutria em solução de glicerol foram retiradas do freezer - 80°C e ambientadas em recipiente com gelo para aumento da temperatura. Em câmara de fluxo laminar, foi colocada uma alíquota de 50 µl de bactérias no tubo contendo o vetor clonado, seguido de homogeneização da solução. Em seguida, todo este conteúdo foi colocado na cubeta, sendo esta fechada e colocada no eletroporador. O pulso elétrico foi aplicado e a alíquota com as bactérias transformadas foi colocada num tubo de 1 mL de meio de cultura SOC Phoneutria, sendo este em seguida colocado numa incubadora BOD a 37°C por 45 minutos.

Foram preparadas placas de Petri com meio de cultura ágar derretido em microondas, seguidas de acréscimo dos antibióticos ampicilina e canamicina (ambos na concentração de 1 µl/mL de meio ágar) e dosagem de 25 mL de meio por placa. Três alíquotas de bactérias transformadas: 50 µl, 100 µl e 300 µl respectivamente foram pipetadas cada qual em uma placa de Petri com meio ágar e antibióticos, sendo em seguidas espalhadas com alça devidamente esterilizada em álcool e chama. As placas foram devidamente identificadas e colocadas na incubadora BOD a 37°C em período de uma noite, procedendo-se a retirada pela manhã para evitar crescimento excessivo de colônias.

Doze colônias de bactérias transformadas foram selecionadas e incubadas em 12 tubos de 1,5 mL contendo 500 µl de meio 2xYT acrescido de 0,5 µl de ampicilina e 0,5 µl de canamicina. Os tubos em seguida foram colocados em Shaker a 38°C para cultivo por uma noite. Sucedida esta etapa, os conteúdos dos tubos foram homogeneizados e estes foram centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos, com subsequente retirada do sobrenadante e preparação da reação de micro-prep das amostras, de acordo com o protocolo do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM).
Utilizando-se soluções prontas de mini-prep Phoneutria, em cada um dos 12 tubos foram colocados 10 µL da solução Prep I (EDTA, Tris, Glicose) em cada colônia de bactérias previamente centrifugada, seguida de homogeneização em vortex. Nos tubos foram colocados, em seguida, 10 µL da solução Prep II (NaOH, SDS) e por último, adicionou-se 10µL da solução Prep III (tampão ácido de acetato) seguida de leve homogeneização. Seguiu-se uma centrifugação por 5 minutos na rotação máxima (13200 rpm) e cada sobrenadante foi transferido para outro tubo, medindo-se devidamente o volume (em microlitros). Foi colocado, então, o dobro de etanol 100% do volume medido, com nova centrifugação por 5 minutos na rotação máxima (13200 rpm), retirada do sobrenadante e lavagem de cada tubo com 150 µL de etanol 70%.

Uma última centrifugação por 5 minutos na rotação máxima (13200 rpm) foi realizada e o etanol foi retirado para secagem dos tubos em temperatura ambiente. Uma vez secos, foram colocados 50 µL de TE (Tris-HCl, EDTA, pH8) em cada tubo para suspensão do DNA, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Cada tubo foi vortexado e uma PCR foi realizada utilizando 2µL de DNA, com os mesmos parâmetros até então utilizados (e com os mesmos primers ITS4 e ITS5), seguida de uma eletroforese em gel de agarose 1,5%.

#### 3.8 Sequenciamento

Todas as reações de sequenciamento de Sanger foram realizadas no aparelho sequenciador ABI3130 Applied Biosystems, utilizando-se eletroforese capilar com polímero POP7 e o terminador fluorescente BigDye v3.1.

Antes de iniciar as reações para sequenciamento, todos os tubos contendo amplicons de FES foram quantificados em ng/µL no quantificador fluorimétrico Qubit 2.0, com procedimentos executados segundo o manual. De acordo com protocolo de sequenciamento do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM), para amplicons de tamanho em torno de 700 pb, a dosagem recomendada para sequenciamento é de 5 a 20 ng de DNA por reação de amplificação. Os primers forward e reverse (ITS5 e ITS4 respectivamente) foram diluídos para a concentração de 0,8 pmol/µL, e devidamente aliquotados.

Para cada amostra de fungo endofítico, foram preparados dois tubos de 0,2 mL, sendo um para a reação forward e o outro para a reação reverse. Em cada tubo foram

colocados: 0,5  $\mu$ L de Mix de reação BigDye Terminator v3.1; 1,5  $\mu$ L de tampão de diluição 5x para sequenciamento com BigDye Terminator; 2  $\mu$ L de primer forward ou reverse (uma opção de primer para cada reação), quantidade em  $\mu$ L de DNA amplicons de fungo endofítico correspondente a aproximadamente 12 ng. Por fim, foi adicionada quantidade suficiente de água ultrapura para totalizar 10  $\mu$ L por tubo.

Todos os tubos foram colocados em um Termocilclador Applied Biosystems para amplificação, de acordo com os seguintes parâmetros: 1 minuto na temperatura de 96°C para desnaturação inicial das fitas de DNA; 15 segundos na temperatura de 96°C para desnaturação das fitas de DNA nos ciclos; 15 segundos na temperatura ótima de 50°C para anelamento dos primers; 4 minutos na temperatura de 60°C para extensão da Taq polimerase; 44 ciclos de repetição e decréscimo gradual da temperatura até 4°C para finalização da etapa.

Seguiu-se então a precipitação, com a adição em cada tubo de 1  $\mu$ L de EDTA 125  $\mu$ M e 26  $\mu$ L de solução de precipitação para cada amostra (1  $\mu$ L de Acetato de Sódio 3M + 25  $\mu$ L de Álcool 100%). Os tubos foram homogeneizados e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 2000g por 45 minutos e retirada dos sobrenadantes com pipeta de 200  $\mu$ L. Em seguida, foram adicionados 35  $\mu$ L de etanol 70% em cada tubo e executada uma nova centrifugação a 1650g por 15 minutos. Por fim, os sobrenadantes foram retirados e os tubos deixados em temperatura ambiente para secar até eliminar o etanol.

Na etapa de suspensão, foram colocados 10 µL de formamida (HI-DI) em cada tubo, seguido de incubação por 3 minutos a 95°C. Terminado o prazo, os tubos foram imediatamente retirados e colocados no gelo para choque térmico e incubação por mais 3 minutos. A etapa foi finalizada transferindo os conteúdos dos tubos para a placa de sequenciamento, que foi então encaminhada ao devido laboratório para o sequenciamento.

#### 3.9 Análises de dados moleculares

Uma vez obtidas as sequências, os arquivos destas foram analisados com o auxílio do programa de Bioinformática "Sequence Scanner V1.0" (Applied Biosystems) e da ferramenta online "Electropherogram Quality Analysis" da página de internet da Universidade de Brasília (http://www.biomol.unb.br/phph/), buscando as identificações das sequências que obtiveram alta qualidade. Para tais, foram observados o eletroferograma e a

sequência de nucleotídeos com as respectivas pontuações de qualidade para cada base (Figura 5).

Foram consideradas apenas as sequências que obtiveram um mínimo de 350 bases de alta qualidade. Para as amostras que geraram ambas as sequências forward e reverse com alta qualidade, foram elaboradas sequências consenso com o "Electropherogram Quality Analysis", que fornece estas juntamente com uma pontuação de qualidade de cada base variando de 0 a 100. Neste caso, foram consideradas apenas as bases que obtiveram uma pontuação mínima de 50 (Figura 6).

Todas as sequências foram então submetidas ao banco de dados do GenBank/NCBI através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para cada sequência, foram realizadas duas buscas: 1) busca com limitação às sequências "type material" (as "sequências tipo" originais depositadas dos materiais que resultaram na primeira identificação da espécie), e 2) busca no banco de dados geral, sem a limitação mencionada (Figura 7).

Para a identificação das amostras deste trabalho, foi levado em consideração principalmente o resultado oriundo da busca com limitação a "sequências tipo", que apresentam dados confiáveis (corroborados pelo GenBank/NCBI) das amostras originais usadas na nomenclatura das espécies. Assim sendo, a busca geral sem limitações foi utilizada apenas como uma referência.



Figura 5: Análises das sequências do FES 05. A parte superior da figura mostra a sequência forward analisada com a ferramenta online "Electropherogram Quality Analysis", enquanto o quadro de baixo mostra o eletroferograma de parte da sequência reverse analisada com o programa "Sequence Scanner V1.0" (Applied Biosystems).

← → C  www.biomol.unb.br/phph/ViewFile?file=192_168_1_12_1601261453782151/seqs_fasta_for_CAP3.cap.ace									
XSERV BLOMOL         Home Help Alternative mirror	Analyse Remote Files Upload Remote Files List General Electropherogram Files List Single Electropherogram Files								
AS 1 2 CO Contig1 616 2 34 U ArgaTATSGTTAAGTTGCAPC0909TATCCCTACTONICOBA09TGAACCT09TTAAAAAA A9GTTG909GT099GCA99O00C09ACCTACTONICOBA09TGCAACCT09TTAAAAAA A9GTTG900C000AAACCAPAACCOTCCCG0FC0CTTG09CC0TCC0CTCT00 99GAA99G509GACC09AAACCAPAACCOTTC09ACC0CCCTC00C 99GAA99G509GACC09AAACCAPAACCAPACCTC09AAGTTGCT BAATCC00CC0CAAACCAPACCAPACCTCAAAAACCOTTC07ACCAPACCAPACCAPACCAPACCAPACCAPACCAPAC									
TACOGRAPACCITGITA									
BQ       14 <td< td=""><td>14 41 37 69 72 69 64 17 87 87 95 92 92 87 18 97 97 97 97 97 97 18 92 92 97 97 97 18 92 92 97 97 97 18 92 92 92 94 19 97 97 19 97 97 97 19 97 97 19 97 97 19 97 97 19 97 97 19 97 97 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 1</td></td<>	14 41 37 69 72 69 64 17 87 87 95 92 92 87 18 97 97 97 97 97 97 18 92 92 97 97 97 18 92 92 97 97 97 18 92 92 92 94 19 97 97 19 97 97 97 19 97 97 19 97 97 19 97 97 19 97 97 19 97 97 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 1								
AF 05_E01_Forward.abl C -472 AF 05_E03_Reverse.abl U 6									

Figura 6: Sequência consenso da amostra de FES 05, elaborada pela ferramenta online "Electropherogram Quality Analysis", juntamente com as respectivas pontuações de qualidades de cada nucleotídeo sequenciado.

BLAST <sup>®</sup> Home Rece	Basic Local Alignment Search Tool nt Results Saved Strategies Help	My NCBI I Sian Inf Resiste
NCBI/ BLAST/ blast	n suite Standard Nucleotide BLAST	
blastn blastp bla	stx tblastn tblastx	
Enter Query	BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide q	uery, more Reset page Bookmark
Enter accession	number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) @ <u>Clear</u> Query subrange @	
	From	
Or, upload file	Excellence and in a second of	
Job Title	Esconer arquivo rivernum arquivo selecionado 🤯	
	Enter a descriptive title for your BLAST search 🛞	
Align two or n	iore sequences 😡	
Choose Sea	ch Set	
Database	Human nenomic + transcrint Mouse nenomic + transcrint @Others (nr etc.):	
	Nucleotide collection (nr/nt)	
Organism		
Optional	Enter organism name or id-completions will be suggested	
Exclude	Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences	
Optional		
Limit to Optional	Sequences from type material	
Entrez Query	You The Create custom database	
Optional	Enter an Entrez query to limit search 😥	

Figura 7: Página de busca por sequências de nucleotídeos da ferramenta BLAST do GenBank/NCBI. A seta indica o campo de seleção para limitar (ou não) as buscas apenas a sequências de material tipo.

Os critérios utilizados para classificação sistemática das amostras identificadas foram estabelecidos e utilizados por Godinho et al. (2013) e Ferreira et al. (2015), sendo estes descritos na Tabela 4. A elucidação das sequências das regiões ITS fornece uma diretriz aceitável para a identificação segura dos morfotaxons em nível de gênero, porém, para classificação da espécie, o uso de outras regiões gênicas (com o intuito de refinamento da classificação), como genes de  $\beta$ -tubulina (Lima et al. 2012), fator de elongação TEF1- $\alpha$  e rRNA polimerase B2 (rpb2) (Pettit et al. 2008), tem sido adicionalmente utilizados. Assim sendo, as identificações apresentadas restringir-se-ão em nível taxonômico de gênero.

Percentual para Cobertura (Query Cover) e Identidade (Identity)	Classificação sistemática aceita
≥99%	Gênero e espécie
98%	Gênero e espécie com o termo "cf" ( <i>confer</i> = comparável a)
Entre 95% e 97%	Gênero
≤95%	Ordem, família ou classificado como "desconhecido"

Tabela 4: Critérios de classificação sistemática dos FES, segundo Godinho et al. (2013) & Ferreira et al. (2015).

Para todas as análises filogenéticas, as sequências dos isolados de FES identificadas pelo GenBank/NCBI foram trabalhadas com o programa de bioinformática MEGA6, para realização dos alinhamentos (com os algorítimos ClustalW ou Muscle), ajustes e também geração das árvores filogenéticas com o algorítimo Neighbor-Joining (NJ) ajustado para 1000 repetições de bootstrap. Como grupo externo foi utilizada a espécie *Trametes versicolor*, do filo Basidiomycota.

A nomenclatura das amostras nas análises filogenéticas foi estabelecida utilizandose a terminologia geral "FESMTXXYZZZPB", sendo: FES = Fungo Endofítico de Soja; MT = Morfotaxon; XX = Número do morfotaxon; Y = Sequência utilizada para identificação (F = Forward, R = Reverse ou C = Consenso); ZZZ = Número de bases da sequência Y; PB = pares de base.

A similaridade dos morfotaxons entre os tratamentos de CO<sub>2</sub> e temperatura foi calculada utilizando o método estatístico "índice de Jaccard", com uso do programa freeware PAST v3.10.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 4.1 Resultados de extrações de DNA, amplificações (PCR) e clonagem

As extrações de DNA utilizando os dois protocolos descritos na metodologia resultaram na obtenção de DNA genômico dos fungos endofíticos de soja dos morfotaxons 03, 04, 05, 13, 14, 17, 19, 21, 25, 31 (A e B), 34, 38 e 39. A figura 8 apresenta as fotos de duas eletroforeses em gel de agarose (uma para cada protocolo), com resultados das extrações indicadas por bandas de alto peso molecular (quando visíveis).



Figura 8: Duas eletroforeses em gel de agarose 0,7% com resultados de extrações de DNA dos fungos endofíticos de soja (Amostras 04, 05, 08, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 21 e 31B). O gel da esquerda corresponde à obtenção bem sucedida do DNA genômico das amostras 04, 05, 13 e 14 utilizando o primeiro protocolo de extração da metodologia, enquanto o gel da direita corresponde à obtenção bem sucedida do DNA genômico das amostras 17, 19 e 21 utilizando o segundo protocolo de extração da metodologia. As setas indicam a região horizontal onde se encontram o DNA genômico das amostras. CP = Controle Positivo.

Amplificações das regiões ITS pela técnica de PCR seguiram-se à obtenção do DNA genômico. A figura 9 apresenta a foto de um gel de agarose do procedimento de amplificação. As bandas bastante visíveis indicam altas concentrações de amplicons com o tamanho esperado (aproximadamente 700 pb).



Figura 9: Eletroforeses em gel de agarose 1% com resultados da PCR (amplificação) da região ITS dos DNAs genômicos dos fungos endofíticos de soja (Amostras 20, 31A, 31B, 35, 35B, 38 e 39). As amostras 20, 34 e 35B não apresentaram amplificações no procedimento executado. LAD = Ladder/Marcador de peso molecular para 700, 500 e 200 pb. CP = Controle Positivo, CN = Controle Negativo.

Conforme previamente relatado, devido ao aparecimento de bandas de produtos inespecíficos na PCR da amostra 17 de FES, foi utilizada a técnica de clonagem com vetor pCR<sup>™</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> TA em bactéria para o isolamento e purificação da banda de interesse e possível investigação acerca do produto inespecífico.

A figura 10 apresenta a foto de um gel de agarose de uma PCR que incluiu a amplificação da amostra 17, que foi submetida à clonagem.



Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR das amostras dos FES 15, 17 e 19. Na canaleta da amostra 17, notam-se duas bandas visíveis, indicando concentrações de amplicons com os tamanhos de aproximadamente 700 pb (produto desejado) e pouco menos de 500 pb (produto inespecífico). LAD752: Padrão de peso molecular para fragmentos de 700, 500 e 200 pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo. A banda de interesse está quadriculada em verde.

Dos 12 tubos da amostra 17 que foram trabalhados, apenas a sub-amostra 17-10 apresentou banda de DNA amplificado (amplicon), sendo esta de tamanho menor que 500 pb (Figura 11), indicando que o amplicon clonado trata-se do produto inespecífico da amostra 17.



Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR das 12 sub-amostras do fungo endofítico 17, clonados em vetor (canaletas 02 a 13). Canaleta 1: Padrão de peso molecular para fragmentos de 700, 500 e 200 pb (LAD752); Canaleta 11: produto inespecífico do FES 17 clonado. Canaleta 14: controle negativo (CN). Canaleta 15: controle positivo (CP, Kit pCR<sup>™</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> TA).

# 4.2 Identificações moleculares da micota endofítica

O trabalho resultou na identificação molecular de 14 morfotaxons dos 22 isolados com base nas sequências obtidas pelo sequenciamento de Sanger (disponíveis no Item 7 - Anexos), ficando 8 morfotaxons restantes para posterior finalização dos trabalhos de identificação. Todos os fungos isolados identificados pertencem ao filo Ascomycota (Tabela 5), sendo comuns em soja as espécies de fungos endofíticos deste filo (Larran et al. 2002; Pimentel, Glienke-Blanco & Gabardo 2006; Bernardi-Wenzel et al. 2012; Leite et al. 2013).

As famílias dos fungos identificados foram: Chaetomiaceae (7, 14%),Crypotococcaceae (14,30%), Glomerellaceae (7,14%), Mycosphaerellaceae (7,14%), Sporormiaceae (7,14%), Trichocomaceae (28,57%), Xylariaceae (28,57%). Os fungos endofíticos das famílias Chaetomiaceae, Glomerellaceae, Trichocomaceae e Xylariaceae neste trabalho foram também observados e descritos em outras variedades de soja por Larran et al. (2002); Pimentel, Glienke-Blanco & Gabardo (2006); Leite et al. (2013). As identificações dos gêneros foram: Aspergillus (40%), Candida (20%), Chaetomium (10%), Colletotrichum (10%), Preussia (10%), Pseudocercospora (10%). Aspergillus, Chaetomium e Colletotrichum são fungos encontrados em quase todos os levantamentos de ocorrência de

fungos endofíticos em soja (Larran et al. 2002; Pimentel et al. 2006; Bernardi-Wenzel et al. 2012; Leite et al. 2013).

Nos tratamentos de concentração de  $CO_2$  ambiente em temperatura ambiente (CA/TA) observou-se a ocorrência de *Aspergillus* sp. (Trichocomaceae), *Chaetomium* sp. (Chaetomiaceae) e Xylariaceae sp., enquanto em concentração de  $CO_2$  ambiente em alta temperatura (CA/AT) foram encontrados *Candida* sp. (Crypotococcaceae), *Pseudocercospora* sp. (Mycosphaerellaceae), *Colletotrichum* sp. (Glomerellaceae) e *Chaetomium* sp. (Chaetomiaceae).

Nos tratamentos de alta concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e temperatura ambiente (AC/TA) foram observados *Aspergillus* sp. (Trichocomaceae) e nos tratamentos com mesma alta concentração de CO<sub>2</sub>, porém em alta temperatura (AC/AT) observou-se a ocorrência de *Preussia* sp. (Sporormiaceae) e Xylariaceae sp. (Tabela 5). Os resultados indicam uma mudança na composição devido ao tratamento. A relação sobre a composição da comunidade endofítica será discutida no item 4.3.

Tabela 5: Descrição das identificações dos FES em diferentes tratamentos de CO<sub>2</sub> e temperatura com base nas buscas no banco de dados GenBank/NCBI, executadas com a ferramenta BLAST. "Sequência" indica qual sequência obtida foi utilizada para realizar a identificação. "Busca" indica os dois tipos de busca realizados: (1) busca limitada apenas às sequências tipo e (2) busca sem limitações no banco de dados. Para o valor de E-value, foi considerado ideal o valor de 0 (zero). Dentre os identificados, apenas os isolados das amostras de FES 03 e 04 foram encontrados em mais de um tratamento. CA/TA: CO<sub>2</sub> Ambiente / Temperatura Ambiente, CA/AT: CO<sub>2</sub> Ambiente / Alta Temperatura, AC/TA: Alto CO<sub>2</sub> / Temperatura Ambiente, AC/AT: Alto CO<sub>2</sub> / Alta Temperatura.

Morfotayon		Tratamentos		Foguância	Tomorho	Bucco	Identificação do	Número de	Cohortura	bortura E Valuo	alua Idantidada	Família	Classificação			
wonotaxon	CA/TA	CA/AT	AC/TA AC/AT		Sequencia	Tamanno	busca	GenBank	Acesso	Copertura	c-value	identidade	i annia	conclusiva		
3	v	v			Povorso	502 pb	(1)	Chaetomium subglobosum	JN209930.1	98%	0.0	99%	Chaotomiacoao	Chaetomium sp.		
(FESMT03R502PB)	^	Χ			Reverse	502 pb	(2)	Chaetomium globosum	<u>KR012911.1</u>	100%	0.0	100%	Chaetonnaceae	(Gênero)		
4		x	x		Consenso	438nh	(1)	Aspergillus caelatus	AF004930.1	100%	0.0	100%	Trichocomaceae	Aspergillus sp.		
(FESMT04C438PB)		X	Λ		Consenso	438pb	(2)	Aspergillus tamarii	<u>KR296875.1</u>	100%	0.0	100%		(Gênero)		
5	V				Cancanca	521 mb	(1)	Aspergillus penicillioides	<u>NR 131285.1</u>	100%	0.0	99%	Trichacomococo	Aspergillus sp.		
(FESMT05C521PB)	^				Consenso	521 po	(2)	Aspergillus penicillioides	<u>KJ775519.1</u>	100%	0.0	100%	Thenocomaceae	(Gênero)		
13					Reverse	285 ph	(1)	Aspergillus versicolor	<u>NR 131277.1</u>	97%	0.0	99%	Trichocomaceae	Aspergillus sp.		
(FESMT13R385PB)			A		neverse	303 pb	(2)	Aspergillus sydowii	<u>KT329202.1</u>	100%	0.0	100%	menocomaceae	(Gênero)		
14			v		Poverce	270 ph	(1)	Aspergillus versicolor	<u>NR 131277.1</u>	97%	0.0	99%	Trichocomacaaa	Aspergillus sp.		
(FESMT14R379PB)			X	Reve	Reverse	379 pp	(2)	Aspergillus sydowii	<u>KT329202.1</u>	100%	0.0	100%	Trichocomaceae	(Gênero)		
17							(1)	Candida duobushaemulonii	<u>NR 130694.1</u>	100%	0.0	100%		Candida sp.		
(FESMT17R372PB)				х		Con	Consenso	372 pb	(2)	Candida duobushaemulonii	<u>KT968732.1</u>	100%	0.0	100%	Crypotococcaceae	(Gênero)

#### Continuação da Tabela 5

Morfotayon		Tratamentos			Soquância	Tamanho	Busca	Identificação do	Número de	Cohortura	obertura F-Value	Idontidado	Família	Classificação
WOTOtaxon	CA/TA	CA/AT	AC/TA	AC/AT	Sequencia	Tamanno	Dusca	GenBank	Acesso	Cobertura	E-Value	luentiuaue	Fallina	conclusiva
19							(1)	Candida duobushaemulonii	NR_130694.1	96%	0.0	99%		Candida sp.
(FESMT19R364PB)		х	X		Reverse	364 pb	(2)	Candida duobushaemulonii	<u>KP862813.1</u>	96%	0.0	99%	Crypotococcaceae	(Gênero)
21		v			Povorco	127 ph	(1)	Pseudocercospora brackenicola	<u>KT037524.1</u>	99%	0.0	100%		Pseudocercospora sp.
(FESMT21R437PB)		^			Reverse	437 pb	(2)	Pseudocercospora norchiensis	EF394859.1	100%	0.0	100%	wycosphaerenaceae	(Gênero)
25		v			Povorco	274 ph	(1)	Colletotrichum queenslandicum	JX010276.1	100%	0.0	100%	Clamarallacaaa	Colletotrichum sp.
(FESMT25R374PB)		^		Reveise	374 po	(2)	Colletotrichum tropicale	<u>KR445685.1</u>	100%	0.0	100%	Giomerenaceae	(Gênero)	
31A	v				Conconco	404 ph	(1)	Hypoxylon fraxinophilum	<u>KC968938.1</u>	98%	6,00E- 150	86%	Vulariagona	Xylariaceae sp.
(FESMT31AC494PB)	ESMT31AC494PB)				Consenso	494 pb	(2)	Hypoxylon submonticulosum	KC968923.1	98%	0.0	94%	Aylahaceae	(Família)
31B	v				<b>C</b>	460 ab	(1)	Daldinia palmensis	<u>JX658510.1</u>	92%	2,00E-145	88%	Vuleriegene	Xylariaceae sp.
(FESMT31BC469PB)	X	^		C		469 pb	(2)	Hypoxylon submonticulosum	<u>KC968923.1</u>	100%	0.0	94%	Xylariaceae	(Família)
34	v				Deverse	474 mb	(1)	Hypoxylon trugodes	KF234422.1	98%	9,00E-133	90%	Vuleriesees	Xylariaceae sp.
(FESMT34R474PB)	^				Reverse	474 pb	(2)	Hypoxylon submonticulosum	<u>KC968923.1</u>	98%	2,00E-176	91%	Xylanaceae	(Família)
38				Ň	D		(1)	Preussia persica	<u>GQ292750.1</u>	92%	0.0	98%	<b>C</b>	Preussia sp.
(FESMT38R446PB)		X		X	Reverse	446 pb	(2)	Preussia sp.	HQ607802.1	100%	0.0	100%	Sporormaceae	(Gênero)
39				v	Povorco	179 ph	(1)	Hypoxylon fraxinophilum	KC968938.1	97%	3,00E-147	87%	Vulariação	Xylariaceae sp.
(FESMT39R478PB)		x		^	Keverse	478 pb	(2)	Hypoxylon submonticulosum	<u>KC968923.1</u>	97%	0.0	95%	Xylariaceae	(Família)

#### 4.3 Análise dos dados moleculares e filogenéticos

Os isolados FESMT04C438PB (tratamentos CA/AT e AC/TA), FESMT05C521PB (tratamento CA/TA), FESMT13R385PB (tratamento AC/TA) e FESMT14R379PB (tratamento AC/TA) foram identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp.. FESMT04C438PB apresentou cobertura e identidade de 100% com a espécie *Aspergillus caelatus*. FESMT05C521PB apresentou cobertura de 100% e identidade de 99% com a espécie *Aspergillus penicillioides*. FESMT13R385PB e FESMT14R379PB apresentaram cobertura de 97% e identidade de 99% com a espécie *Aspergillus versicolor* (Figura 12).

Um alinhamento realizado entre as sequências de FESMT13R385PB e FESMT14R379PB apresentou 100% de identidade, com a sequência de FESMT13R385PB sendo 6 nucleotídeos mais longa. Este dado favorece a hipótese de ambos isolados serem, provavelmente, indivíduos da mesma espécie. A comparação morfológica (Tabela 2) revela semelhanças entre ambos, com leves variações em três características (cor principal, textura e cor do verso da cultura).

O gênero *Aspergillus* já foi encontrado em outros estudos de composição da diversidade fúngica endofítica da soja, como no trabalho de Pimentel et al. (2006), que inclusive descreve a possibilidade de uso biotecnológico de espécies do gênero no controle de insetos e pragas. Dalal & Kulkarni (2014), em um estudo sobre diversidade endofítica em diferentes estágios vegetativos da soja, identificou 3 morfotaxons diferentes de *Aspergillus*, e observou o fato deste gênero também ser endofítico de videiras (*Vitis vinifera* L.) e da planta medicinal *Hyoscyamus muticus*, de onde derivam os alcaloides medicinais atropina, hiosciamina e escopolamina.



Figura 12: Árvore filogenética demonstrando as proximidades dos isolados FESMT04C438PB, FESMT05C521PB, FESMT13R385PB e FESMT14R379PB em relação às respectivas espécies retornadas nas buscas com o BLAST (GenBank/NCBI).

Os isolados FESMT17R372PB (tratamento CA/AT) e FESMT19R364PB (tratamento CA/AT) foram identificados como *Candida* sp. (Figura 13), cujo gênero na natureza pode ocorrer como levedura ou filamentoso, porém, pouco ocorrente enquanto endofítico. Uma vez que ambas as sequências estão muito próximas do limite mínimo de 350 pb para identificação, os sequenciamentos para ambos isolados serão refeitos, buscando-se um novo valor mínimo de corte para quantidade de bases sequenciadas a serem submetidas ao banco de dados (acima de 400 pb), no intuito da busca de uma identificação mais acurada.

Entretanto, alguns dados relativos aos tratamentos permanecem relevantes (ambos isolados foram encontrados no tratamento CA/AT). Como informação, FESMT17R372PB apresentou cobertura e identidade de 100% com a espécie *Candida duobushaemulonii*, enquanto FESMT19R364PB apresentou cobertura de 96% e identidade de 99% com a mesma espécie citada, sendo a diferença entre os dois isolados de 8 nucleotídeos e o alinhamento entre estes resultando em 328 pares de bases coincidentes e sequenciais.



0.2

Figura 13: Árvore filogenética de FESMT17R372PB e FESMT19R364PB, e relações com as respectivas espécies retornadas nas buscas com o BLAST (GenBank/NCBI).

Os isolados FESMT31AC494PB e FESMT31BC469PB (duplicata do morfotaxon 31 e ambos do tratamento CA/TA), FESMT34R474PB (tratamento CA/TA) e FESMT39R478PB (tratamento AC/AT) (Figura 14) foram classificados apenas no táxon da família Xylariaceae pois obtiveram, nas buscas do BLAST, valores percentuais de cobertura e/ou identidade insuficientes de acordo com os critérios e parâmetros estabelecidos (menores que 95%) e valores indesejáveis para E-value (diferente de zero). No entanto, tais circunstâncias podem ser indicativas de se tratarem de novas espécies. Na duplicata do morfotaxon 31, a diferença entre as duas amostras foi de 25 nucleotídeos, sendo o alinhamento entre estes resultante em 469 pares de bases coincidentes e sequenciais.

A família Xylariaceae abrange cerca de 155 gêneros conhecidos (MycoBank Database 2016). Gêneros de Xylariaceae são frequentemente encontrados em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo. São descritos comumente como decompositores de madeira e também constantemente documentados como endofíticos de diversas plantas, incluindo a soja (Leite et al. 2013).



Figura 14: Árvore filogenética demonstrando as proximidades dos isolados FESMT31AC494PB, FESMT31BC469PB, FESMT34R474PB e FESMT39R478PB em relação às respectivas espécies retornadas nas buscas com o BLAST (GenBank/NCBI).

O isolado FESMT03R502PB (tratamentos CA/TA e CA/AT) foi identificado como pertencente ao gênero *Chaetomium* sp., apresentando cobertura de 98% e identidade de 99% com as espécies *Chaetomium* subglobosum e *Chaetomium* angustispirale (Figura 15). O gênero *Chaetomium* engloba cerca de 410 espécies e subespécies descritas (Mycobank Database 2016), sendo encontrado em outros estudos de composição da diversidade fúngica endofítica da soja e de outras espécies, como a videira *Vitis vinifera* L., trigo (*Triticum* spp.) e plantas medicinais da família Rutaceae. Espécies do gênero *Chaetomium* têm sido testadas como agentes de controle biológico, apresentando excelentes resultados no controle do fungo fitopatógeno *Diaporthe phaseolorum*, causador da antracnose em plantas variadas, incluindo a soja (Pimentel et al. 2006; Leite et al. 2013; Dalal & Kulkarni 2014).

50 <sup>-</sup>	FESMT03R502PB Chaetomium sp.
43	JN209862.1 Chaetomium angustispirale
51	JN209930.1 Chaetomium subglobosum
	JN209863.1 Chaetomium coarctatum
	KC109750.1 Chaetomium globosporum
	AF042324.2 Trametes versicolor

Figura 15: Árvore filogenética demonstrando a proximidade do isolado FESMT03R502PB em relação às espécies retornadas nas buscas com o BLAST (GenBank/NCBI).

1

O isolado FESMT25R374PB (tratamento CA/AT) foi identificado como pertencente ao gênero *Colletotrichum* sp., apresentando 100% de cobertura e identidade com todas as espécies de mesmo gênero apresentadas na árvore filogenética da Figura 16. O gênero engloba cerca de 760 espécies descritas (Mycobank Database 2016), sendo o termo *Colletotrichum* associado ao seu estágio assexual e seu anamorfo intitulado *Glomerella* ao estágio sexual (Fernandes et al. 2015). O gênero foi encontrado em vários outros estudos de diversidade fúngica endofítica da soja (Dalal & Kulkarni 2014; Pimentel et al. 2006; Larran et al. 2002; Fernandes et al. 2015), sendo não apenas uma das espécies mais frequentemente encontradas, como também o gênero dominante encontrado nas variedades da soja "Monsoy" e "Conquista", nos experimentos de Leite et al. (2012). Além de atuar como decompositor na fase de senescência das folhas, também é conhecido como um dos agentes causadores da antracnose. O gênero, no entanto, foi encontrado nos experimentos com soja de Pimentel et al. (2006) sem causar sinais de patogenicidade. Freeman & Rodrigues (1993) explicaram que variantes endofíticas e patogênicas deste gênero podem ser obtidas uma da outra por um simples evento mutacional.

# FESMT25R374PB|Colletotrichum sp. JX010276.1|Colletotrichum queenslandicum NR 120142.1|Colletotrichum clidemiae NR 120141.1|Colletotrichum alienum NR 120140.1|Colletotrichum aenigma NR 120133.1|Colletotrichum aeschynomenes GU994372.2|Colletotrichum ignotum GQ485600.1|Colletotrichum hymenocallidis

AF042324.2|Trametes versicolor

0.1

Figura 16: Árvore filogenética demonstrando a relação de 100% de cobertura e identidade do isolado FESMT25R374PB com as espécies retornadas nas buscas com o BLAST (GenBank/NCBI).

O isolado FESMT38R446PB (tratamento AC/AT) foi identificado como *Preussia* sp., apresentando cobertura de 92% e identidade de 98% com a espécie *Preussia persica* (Figura 17). O gênero *Preussia* engendra cerca de 90 espécies descritas (Mycobank Database 2016) e foi encontrado em outros estudos como endofítico da videira Niagara Rosada (*Vitis labrusca L.*) por Brum et al. (2012). Em ensaios antimicrobianos, apresentou atividade antifúngica contra *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo micótico endêmico no Brasil e países da América do Sul (Vieira et al. 2014), enquanto que Zaferanloo. et al (2014) encontraram possibilidades promissoras na utilização de *Preussia* endofítica como fornecedora de amilases para uso industrial.



Figura 17: Árvore filogenética demonstrando a proximidade do isolado FESMT38R446PB em relação às espécies retornadas nas buscas com o BLAST (GenBank/NCBI).

O isolado FESMT21R437PB (tratamento CA/AT) foi identificado como *Pseudocercospora* sp., apresentando cobertura de 95% e identidade de 100% com a espécie *Pseudocercospora norchiensis* (Figura 18). O gênero *Pseudocercospora* apresenta quase 1700 espécies descritas (Mycobank Database 2016) e possui citações como endófito da myrtaceae *Syzygium cordatum* (Marsberg et al. 2004) e da faia japonesa *Fagus crenata* (Kaneko & Kakishima 2001), onde é descrito como anamorfo do fungo *Mycosphaerella buna*.



0.05

Figura 18: Árvore filogenética demonstrando a proximidade do isolado FESMT21R437PB em relação às espécies retornadas nas buscas com o BLAST (GenBank/NCBI).

Na árvore filogenética com os 14 isolados (Figura 19), foram separados 5 grupos com as variáveis em comum destacadas (entre colchetes). Foi inferida uma maior relação filogenética das espécies com base em gêneros, famílias e tratamentos, onde foi observado que as condições de temperatura (tanto a ambiente quanto a alta) influíram mais na discrepância entre os grupos do que as concentrações de CO<sub>2</sub> atmosferico.



0.05

Figura 19: Árvore filogenética dos 14 isolados de FES gerada pelo algorítimo Neighbor-Joining com 1000 repetições de bootstrap com base no método de alinhamento Muscle. Grupo externo: *Trametes versicolor* [AF042324.2]. Cores dos tratamentos: CA/TA (verde), CA/AT (laranja), AC/TA (azul), AC/AT (vermelho); CA/AT e CA/TA (roxo); CA/AT e AC/TA (rosa).

Analisando os dados morfológicos disponíveis na tabela de morfotaxons (Tabela 2) com os dados de filogenia da figura 19, percebem-se as possibilidades dos isolados FESMT13R385PB e FESMT14R379PB (ambos do gênero *Aspergillus*) e dos isolados FESMT17R372PB e FESMT19R364PB (ambos do mesmo gênero *Candida*) poderem, de fato, constituírem-se de duplicatas das mesmas espécies apresentando pequenas variações morfológicas (cor principal, secundária e do verso da cultura; textura e aspecto da borda).

#### 4.4 Relação dos tratamentos de CO<sub>2</sub> e a comunidade da micota endofítica

A composição dos fungos endofíticos encontrada na soja altera com o tratamento de CO<sub>2</sub> e temperatura (Tabelas 2, 5 e 6). Observou-se que o gênero Chaetomium foi encontrado nos tratamentos de CO<sub>2</sub> ambiente em temperatura ambiente e alta temperatura (Tabela 5 e 6). O gênero Aspergillus foi encontrado nos tratamentos de temperatura ambiente na concentração de CO<sub>2</sub> ambiente e alto CO<sub>2</sub> atmosférico. Foi verificada uma baixa similaridade entre os fungos presentes em cada tratamento (Tabela 7), apoiando as afirmações acerca da mudança de diversidade endofítica em decorrência do aumento de CO<sub>2</sub> e/ou temperatura. A diversidade endofítica do tratamento CA/AT assemelha-se ao tratamento CA/TA em apenas 11% (devido à ocorrência concomitante apenas do fungo endofítico Chaetomium sp. em ambos), e assemelha-se ao tratamento AC/TA em apenas 12,5% (devido à ocorrência apenas do fungo endofítico Aspergillus sp. em ambos). Ainda de acordo com estes dados, partindo das condições ambientes (CA/TA), o simples aumento da concentração de CO<sub>2</sub> foi suficiente para alterar a composição da comunidade endofítica. Oki et al. (trabalho em revisão na Plos One), verificou que só o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico foi capaz de alterar a estrutura e os nutrientes das folhas de Baccharis dracunculifolia e 50% da composição da comunidade da micota endofítica das folhas.

					_		
<u>Mt</u>	<u>Identificação</u>	<u>CA/TA</u>	CA/AT	<u>AC/TA</u>	AC/AT	<u>Ocori</u> (№ de tra	r <b>ência</b> tamentos)
03	Chaetomium sp.	2	1	-	-	2	2
04		-	1	1	-	2	
05	Aspergillus sp.	3	-	-	-	1	
13		-	-	1	-	1	3
14		-	-	1	-	1	
17	Condida on	-	1	-	-	1	1
19	Canalad sp.	-	1	-	-	1	
21	Pseudocercospora sp.	-	1	-	-	1	1
25	Colletotrichum sp.	-	1	-	-	1	1
31		1	-	-	-	1	
34	Xylariaceae sp.	1	-	-	-	1	2
39		-	-	-	1	1	-
38	Preussia sp.	-	-	-	1	1	1
	Isolados (Identificados)	7	6	3	2		•
-	Rigueza (Identificados)	4	6	3	2		-

Tabela 6: Resumo das ocorrências dos morfotaxons identificados molecularmente e gêneros em função dos tratamentos.

Tratamentos	CA/TA	CA/AT	AC/TA	AC/AT
CA/TA	1	0,111111	0	0
CA/AT	0,111111	1	0,125	0
AC/TA	0	0,125	1	0
AC/AT	0	0	0	1

Tabela 7: Similaridade de morfotaxons dos fungos endofíticos molecularmente identificados entre os quatro tratamentos de cultivo da soja.

Neste estudo com a soja, quando a concentração de CO<sub>2</sub> e de temperatura se encontraram aumentadas, observou-se a menor frequência e riqueza de fungos endofíticos, demonstrando que estes extremos constituíram-se nas condições de maior pressão seletiva. No entanto, o aumento apenas da temperatura gerou uma notada elevação na riqueza e diversidade dos fungos, enquanto que apenas o aumento na concentração de CO<sub>2</sub> não gerou resultados de mesma magnitude. Compant, van der Heijden & Sessitsch (2010) citam que o aumento de temperatura constitui-se em importante fator de impacto na ocorrência de fungos endofíticos nos tecidos de plantas, devido a um maior metabolismo fúngico e aumento da densidade fúngica em determinados tecidos da planta.

As evidentes mudanças da composição da comunidade endofítica e alterações da frequência e riqueza de espécies observadas na soja, em diferentes tratamentos de CO<sub>2</sub> e de temperatura, também podem ter ocorrido devido às mudanças nutricionais das folhas da soja (encontradas nestes tratamentos por Bordignon 2015) (Tabela 8). Os tratamentos com alta temperatura (AT) acarretaram aumento da concentração de nitrogênio foliar, sendo as maiores concentrações encontradas nas folhas de CA/AT (Bordignon 2015). O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico resultou no aumento de C e diminuição de N foliares, aumentando a razão C:N e caracterizando o "efeito da diluição do nitrogênio" devido às maiores taxas fotossintéticas, que assimilam a maior disponibilidade de carbono atmosférico, mas não resultam em absorção proporcional de nitrogênio.

Tratamentos	Carbono (C)	Nitrogênio (N)	C:N
CA/TA	51,735±0,117	3,206±0,241	17,244± 1,702
CA/AT	51,894± 0,33	3,774±0,104*	13,845± 0,403
AC/TA	51,999±0,17	2,864± 0,179	19,153± 1,836*
AC/AT	52,227±0,97	3,031±0,096	17,406± 0,619
р	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05

Tabela 8: Dados sobre as concentrações de carbono, nitrogênio e razão entre C e N foliar nos quatro tratamentos avaliados. (\*) Indica diferença significativa (p < 0.05). (Fonte: Bordignon 2015).

Estas mudanças do perfil fisiológico influem diretamente na diversidade da micobiota endofítica da soja. Compant, van der Heijden & Sessitsch (2010) reuniram dados comprovando que a alteração das concentrações de carbono, nitrogênio e metabólitos secundários diversos em decorrência do aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> repercutem alterando a composição fúngica endofítica das plantas. E esta alteração, por sua vez, influencia e altera as relações de taxa de colonização, dominância e prevalência entre os fungos endofíticos e as plantas hospedeiras (Larran et al. 2002).

As tabelas 2, 5 e 6 com os dados de ocorrência e prevalência nos tratamentos dos isolados e morfotaxons identificados neste experimento apoiam as constatações então inferidas. Os taxons identificados do gênero *Aspergillus* sp. ocorreram prevalentemente em ambientes de temperatura ambiente, enquanto *Preussia* sp. foi observado em altas de concentração de CO<sub>2</sub> e temperatura. O resultado indica uma alteração de ocorrência das espécies dependendo do tratamento.

As implicâncias das alterações na diversidade da micota endofítica nas plantas (incluindo a soja) são tão imprevisíveis como também variadas e abrangentes. Um fungo endofítico de baixa prevalência (no contexto de dominância dentro de uma planta) pode, em consequência do aumento das concentrações de CO<sub>2</sub> e temperatura, passar a ser a espécie dominante, alterando seriamente o perfil metabólico e fisiológico de seu hospedeiro, acarretando impactos ambientais e ecológicos nos mais diversificados níveis. Compant, van der Heijden & Sessitsch (2010) citam o exemplo do gênero fúngico endofítico *Neotyphodium*, normalmente ocorrente em pequena abundância em pastagens (espécie não dominante), mas que apresentou maior colonização das mesmas em condições de elevado CO<sub>2</sub>. Sendo este gênero um produtor de toxinas nocivas à alimentação de ruminantes, sua colonização e prevalência em decorrência destas alterações ambientais tornam-se problemáticas e podem, por exemplo, impactar diretamente a pecuária e economia de suas regiões endêmicas.

A alteração de dominância na comunidade endofítica de uma planta, ou a eliminação e/ou substituição de espécies por conta do aumento de temperatura também podem resultar na perda de uma adaptação da planta a fatores abióticos, conferida pela simbiose entre a planta e seus fungos endofíticos. Um exemplo que ilustra uma situação de perda foi demonstrado por Redman et al. (2002), que descreveram a simbiose do fungo endofítico de gênero *Curvularia sp.* com a gramínea *Dichanthelium lanuginosum*, presente em solos geotérmicos nos parque nacionais vulcânicos de Lassen e Yellowstone (ambos dos Estados Unidos). Gramíneas colonizadas com o fungo endofítico possuem termotolerância a temperaturas anuais ambientais flutuantes entre 20 e 50 °C, sendo que, em experimentos conduzidos, a tolerância chegou a temperaturas como 65 °C. Quando o fungo endofítico foi removido da planta em experimentos, as plantas sem simbiontes tornaram-se atrofiadas e cloróticas na temperatura de 50 °C, e morreram ao serem submetidas à temperatura de 65 °C. Isto exemplifica uma possibilidade de perda adaptativa simbiôntica que plantas e cultivares, como a soja, estão sujeitas.

Por fim, as mudanças fisiológicas decorrentes das citadas alterações endofíticas também pode alterar fatores bióticos como a herbivoria. Bordignon (2016) verificou, nos experimentos de tratamentos com aumento de CO<sub>2</sub>, que uma conhecida lagarta praga da soja (a lepidóptera *Spodoptera frugiperda*) aumentou seu consumo das folhas de soja como forma de suprir suas necessidades nutricionais, devido à redução da concentração de nitrogênio foliar (redução esta também ocorrida devido à alteração da comunidade fúngica endofítica, que contribui na fixação de nitrogênio).

Todos estes exemplos supracitados demonstram a seriedade dos impactos causados pelos aumentos de temperatura e  $CO_2$  atmosférico e a urgente necessidade de providências e medidas, tanto políticas, ecológicas e ambientais para corrigir e mitigar o impacto ambiental antrópico, a fim de evitar que os biomas e espécies terrestres caiam em condições ambientais críticas e com consequências danosas e imprevisíveis.

# 5. CONCLUSÕES

Os táxons de fungos endofíticos de soja (*Glycine max*, variedade BRS-MG 760S EMBRAPA soja) encontrados neste estudo com base no sequenciamentos da região ITS foram: pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. (4 espécies), *Candida* sp. (2 espécies), *Chaetomium* sp. (1 espécie), *Colletotrichum* sp. (1 espécie), *Preussia* sp. (1 espécie), *Pseudocercospora* sp. (1 espécie) e da família Xylareaceae sp. (4 espécies). A análise filogenética entre estes fungos identificou uma tendência de separação de grupos por tratamento das plantas de soja.

As altas concentrações de  $CO_2$  e temperatura modificaram substancialmente a composição da micota endofítica da soja (*Glycine max*, variedade BRS-MG 760S EMBRAPA soja). Os resultados sugerem a ocorrência de substituições de espécies devido às mudanças das concentrações de  $CO_2$  e temperatura. Tais decorrências podem resultar em consequências danosas, imprevisíveis, variadas e abrangentes devido à alteração e/ou eliminação das relações simbióticas entre as plantas e seus fungos endofíticos e das vantagens adaptativas inerentes às simbioses, o que reforça a necessidade de medidas globais de combate ao aumento das concentrações de  $CO_2$  atmosférico e da temperatura global.

O conhecimento gerado neste trabalho possibilita o aprofundamento no conhecimento das espécies endofíticas da soja, suas vantagens adaptativas conferidas à planta em decorrência da interação simbionte, e as possíveis perdas e ganhos decorrentes das alterações das espécies fúngicas endofíticas devido às condições ambientais previstas para as próximas décadas.

# 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainsworth E. A., Davey P. A., Bernacchi C. J., Dermody O. C., Heaton E. A. H., Moore D. J., Morgan P. B., Naidu S. L., Yoo Ra H.-s, Zhu X.-g, Curtis P. S., Long S. P. A meta-analysis of elevated [CO<sub>2</sub>] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. Global Change Biology 8: 695-709. 2002.

Arnold A. E., Miadlikowska J., Higgins K. L., Sarvate S. D., Gugger P., Way A., Hofstetter V., Kauff F., Lutzoni F. A Phylogenetic estimation of trophic transition networks for Ascomycetous fungi: Are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? Systematic Biology 58: 283-297. 2009.

Arnold A. E., Herre E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). Mycologia 95: 388-398. 2003.

Articles Factory. Disponível em: http://www.articlesfactory.com/articles/marketing/paclitaxelranks-first-among-worlds-anti-cancer-drugs.html (Acesso em 20 de abril de 2015). 2012.

Bascom-Slack C. A., Arnold A. E., Strobel S. A. Student-directed discovery of the plant microbiome and its products. Science 338: 485-486. 2012.

Bernardi-Wenzel J., Siqueira A. L., Burin F. A. G., Hein D. P. R., Silveira J. A., Romani S. Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos isolados de soja (*Glycine max* L.(Merril)). SaBios: Revista de Saúde e Biologia 7: 86-96. 2012.

Bezemer T. M., Jones T. H. Plant-insect herbivore interactions in elevated atmospheric CO<sub>2</sub>: quantitative analysis and guild effects. Oikos 82: 212-222. 1998.

Blagodatskaya E., Blagodatsky S., Dorodnikov M., Kuzyakov Y. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> increases microbial growth rates in soil: results of three CO<sub>2</sub> enrichment experiments. Global Change Biology 16: 836-848. 2010.

Bordignon L. Efeito do aumento do CO<sub>2</sub> e da temperatura nas interações biológicas de soja (*Glycine Max*) (L.) Merr. Exame de Qualificação de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2015.

Bordignon, L. Efeitos do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e da elevação da temperatura em plantas e suas interações biológicas. 29 de Abril de 2016. 168 f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida

Silvestre. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2016.

Brum M. C. P., Araújo W. L., Maki C. S., Azevedo J. L. Endophytic fungi from *Vitis labrusca*L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*.Genetics and Molecular Research 11: 4187-4197. 2012.

Compant S., van der Heijden M.G.A., Sessitsch A. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology 73: 197-214. 2010.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos. Safra 2009/2010. Quarto Levantamento. Janeiro/2010. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos\_09.12.pdf (Acesso em 20 de abril de 2015).

Coviella C. E., Trumble J. T. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. Conservation Biology 13: 700-712. 1999.

Dalal J. M., Kulkarni N. S. Population variance and diversity of endophytic fungi in soybean (*Glycine max* (L) Merril). Research and Reviews: Journal of Botanical Sciences 3: 33-39. 2014.

De Hoog G. S., Göttlich E., Platas G., Genilloud O., Leotta G., van Brummelen J. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. Studies in Mycology 51: 33-76. 2005.

Dukes J. S. Will the increasing atmospheric  $CO_2$  concentration affect the success of invasive species? In: Mooney H. A., Hobbs R. J. (Eds.) Invasive species in a changing world. Washington, USA, Island Press: 95-113. 2000.

EMBRAPA. Dados Econômicos 2010. Embrapa Soja. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\_page=294&cod\_pai=17. (Acesso em 20 de abril de 2015).

Fernandes E. G., Pereira O. L., Silva C. C., Bento C. B. P., Queiroz M. V. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. Microbiological Research 181: 84-92. 2015.

Ferreira M. C., Vieira M. D. L. A., Zani C. L., Alves T. M. D. A., Junior P. A. S., Murta S. M. F., Romanha, A. J., Gil L. H. V. G., Carvalho A. G. O., Zilli J. E., Vital M. J. S., Rosa C. A., Rosa L. H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of

endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). Biochemical Systematics and Ecology 59: 36-44. 2015.

Freeman S., Rodriguez R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. Science 260: 75-78. 1993.

Fungaro M. H. P. PCR na Micologia. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 14: 12-16. 2000.

Godinho V. M., Furbino L. E., Santiago I. F., Pellizzari F. M., Yokoya N. S., Pupo D., Diclá A.,
Alves T. M. A., Junior P. A. S., Romanha A. J., Zani C. L., Cantrell C. L., Rosa C. A., Rosa L.
H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and coldadapted macroalgae in Antarctica. The International Society for Microbial Ecology Journal 7: 1434-1451. 2013.

Hawksworth D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research 105: 1422-1432. 2001.

Hughes L., Bazzaz F. A. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on interactions between the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) and the common milkweed *Asclepias syriaca*. Oecologia 109: 286-290. 1997.

Hunter M. D. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. Agricultural and Forest Entomology 3: 153-159. 2001.

IPCC. Climate Change 2014: Synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Eds. Pachauri R.K., Meyer L. A. (Eds.) Geneva. IPCC. 151 pp. 2014.

Johnson R. D., Borchert S., Christensen M. J., Johnson L. J., Koulman A., van Gils M. J., Bryan G.T. A gene identified from *Neotyphodium Iolii* is expressed only *in planta* and regulates the biosynthesis of a putative oligopeptide secondary metabolite. Popay A, Thom ER, editors. Proceedings of the 6th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses. Grasslands Research and Practice Series 13. New Zealand Grassland Association, Christchurch, New Zealand. pp 485-489. 2007.

Kaneko R., Kakishima M. *Mycosphaerella buna* sp. nov. with a *Pseudocercospora* anamorph isolated from the leaves of Japanese beech. Mycoscience 42: 59-66. 2001.

Larran S., Rollán C., Ángeles H. B., Alippi H. E., Urrutia M. I. Endophytic fungi in healthy soybean leaves. Investigación agraria: Producción y protección vegetales, 17: 173-178. 2002.

Leite T. S., Cnossen-Fassoni A., Pereira O. L., Mizubuti E. S. G., Araújo E. F., Queiroz M. V. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. Journal of Microbiology 51: 56-69. 2013.

Lima J. S., Figueiredo J. G., Gomes R. G., Stringari D., Goulin E. H., Adamoski D., Kava-Cordeiro V., Galli-Terasawa L. V., Glienke C. Genetic diversity of *Colletotrichum spp.* an endophytic fungi in a medicinal plant, brazilian Pepper tree. International Scholarly Research Network Microbiology 2012: 1-12. 2012.

Lincoln D. E., Fajer E. D., Johnson R. H. Plant-insect herbivore interactions in elevated CO<sub>2</sub> environments. Trends in Ecology and Evolution 8: 64-68. 1993.

Marsberg A., Slippers B., Wingfield M. J., Gryzenhout M. Endophyte isolations from *Syzygium cordatum* and a *Eucalyptus* clone (Myrtaceae) reveal new host and geographical reports for the Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae. Australasian Plant Pathology 43: 503-512. 2014.

MycoBank Database. Disponível em: http://www.mycobank.org/ (Acesso em 05 de janeiro de 2016).

NASA. Earth observatory: global patterns of carbon dioxide. Disponível em http://earthobservatory.nasa.gov/IOTD/view.php?id=82142. (Acesso em 20 de março de 2014). 2013.

Newman J. A., Abner M. L., Dado R. G., Gibson D. J., Brookings A., Parsons A. J. Effects of elevated CO<sub>2</sub>, nitrogen and fungal endophyte-infection on tall fescue: growth, photosynthesis, chemical composition and digestibility. Global Change Biology 9: 425-437. 2003.

O'Brien H. E., Parrent J. L., Jackson J. A., Moncalvo J. M., Vilgalys R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. Applied and Environmental Microbiology 71: 5544-5550. 2005.

Oki Y., Fernandes G. W., Sanchez-Azofeifa A., Berbara R., Belmiro M. S., Moreira R. G., Kalapothakis E. CO<sub>2</sub> enrichment influence the development, spectral signature and endophyte richness of a tropical shrub. Plos One (submetido). 2012.

Omacini M., Chaneton E. J., Ghersa C. M., Müller C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. Nature 409: 78-81. 2001.

Owensby C. E., Ham J. M., Knapp A. K., Auen L. M. Biomass production and species composition change in a tallgrass prairie ecosystem after long-term exposure to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. Global Change Biology 5: 497-506. 1999.

Pennisi E. Fungi shield new host plants from heat and drought. Science 301: 1466. 2003.

Petti C. A., Bosshard P. P., Brandt M. E., Clarridge J. E., Feldblyum T.V., Foxall P., Furtado M. R., Pace N., Procop G. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing. Clinical And Laboratory Standards Institute Approved Guideline. CLSI document MM18-A, Volume 28: 1-14. 2008.

Pimentel I. C., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Stuart R. M., Azevedo J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merril) under different environmental conditions. Brazilian Archives of Biology and Technology 49: 705-711. 2006.

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.

Redman R. S., Sheehan K. B., Stout R. G., Rodriguez R. J., Henson J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. Science 298: 1581. 2002.

Rillig M. C., Field C. B., Allen M. F. Fungal root colonization responses in natural grasslands after long-term exposure to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. Global Change Biology 5: 577-585. 1999.

Rodriguez R. J., White Jr J. F., Arnold A. E., Redman R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist 182: 314-330. 2009.

Rodriguez R. J., Redman R. S., Henson J. M. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. Mitigation and adaptation strategies for global change 9: 261-272. 2004.

Rosa L. H., Vaz A. B. M, Caligiorne R. B., Campolina S., Rosa C. A. Endophytic fungi associated with the antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). Polar Biology 32: 161-167. 2009.

Rudgers J. A., Koslow J. M., Clay K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. Ecology Letters 7: 42-51. 2004.

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.

Soliman S. S. M, Trobacher C. P., Tsao R., Greenwood J. S., Raizada M. N. A fungal endophyte induces transcription of genes encoding a redundant fungicide pathway in its host plant. BioMed Central Plant Biology 13: 93. 2013.

Stiling P., Cornelissen T. How does elevated CO<sub>2</sub> impact plant-herbivore interactions? A field experiment and meta-analysis of CO<sub>2</sub>-mediated changes on plant chemistry and herbivore performance. Global Change Biology 13: 1823-1842. 2007.

Stocker T. F., Qin D., Plattner G. -K., Tignor M., Allen S. K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P. M. (Eds.) Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom; New York, USA. Cambridge University Press. 2013.

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

Tameirão L. B. S. Efeitos do aumento de  $CO_2$  e temperatura na colonização de soja (*Glycine max* L. Merril) e milho (*Zea mays* L.) por fungos endofíticos. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro universitário UNA. Belo Horizonte. 2013.

U'Ren J. M., Dalling J. W., Gallery R. E., Maddison D. R., Davis E. C., Gibson C. M., Arnold A. E. Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a neotropical pioneer tree: a case study for analysing fungal environmental samples. Mycological Research 113: 432-449. 2009.

Vieira M. L. A., Johann S., Hughes F. M., Rosa C. A., Rosa L. H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. Canadian Journal of Microbiology 60: 847-856. 2014.

Watt A. D., Whittaker J. B., Docherty M., Brooks G., Lindsay E., Salt D. T. The impact of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on insect herbivores. (Eds) In: Harrington R. & Stork N. E., pp 198-217. Insects in a changing environment: symposium of the Royal Entomological Society. Academic Press. London. 1995.

Westcott P. USDA Agricultural Projections to 2021. Office of the Chief Economist, World Agricultural Outlook Board, U.S. Department of Agriculture. Prepared by the Interagency Agricultural Projections Committee. Long-term Projections Report OCE-2012-1, 102 pp. 2012.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York, USA. Academic Press, Inc. p. 315-322. 1990.

Whittaker S. P., Cairney J. W. G. Influence of amino acids on biomass production by ericoid mycorrhizal endophytes from *Woollsia pungens* (Epacridaceae). Mycological Research 105: 105-111. 2001.

Zaferanloo B., Bhattacharjee S., Ghorbani M. M., Mahon P. J., Palombo E. A. Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. BioMed Central Microbiology 14: 55. Hawthorn. 2014.

# 7. ANEXOS

# 7.1. Sequências dos fungos endofíticos isolados

A seguir, encontram-se as sequências dos 14 isolados de fungos endofíticos de soja (*G. max*, vB760S) obtidas através do sequenciamento de Sanger e utilizadas neste trabalho. Entre parênteses estão a sequência usada (forward, reverse ou consenso) para a submissão no banco de dados e seu sentido de escrita.

#### Morfotaxon 03 - 502 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

CGGCCGGAACCCGCGCGCGCGACCAGAGCGAGATGTATGCTACTACGCTCGGTGCGACAGCGAGCCCGCCACTGCTTTTC AGGGCCTGCGGCAGCCGCAGGTCCCCAACACAAGCCCGGGGGGCTTGATGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCG CCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTC GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTTATTCAGTACAGAAGACTCAGAAGAGC CATAAATTATCAAGAGTTTGGTGACCTCCGGCGGCGCCCGCGGTGGGGCCCCAGGGGGCGCCCGGGGGGGTAAACCCCGG GGCCGCCCGCCGAAGCAACGGTATAGGTAACGTTCACAATGGTTTAGGGAGTTTTGCAACTCTGTAATGATCCCTCCGCTG GTTCACCAACGGAGACCTTGT

# Morfotaxon 04 - 438 pb (Consenso: $5' \rightarrow 3'$ )

#### Morfotaxon 05 - 521 pb (Consenso: $5' \rightarrow 3'$ )

# Morfotaxon 13 - 385 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

ACGACCCAACACACAAGCCGGGGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGGGCGC AATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGC CGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTTATATTCAGACTCAGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCA GTAGTCCCCGGCGGCTCGCCCCGAGGGGGGTTCCCCGCCGAAGCAACAGTGTTAGGTATTCACGGGTGGGAGGTTGGGC GCCCGGAGGCAGCCCGCACTCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGT

# Morfotaxon 14 - 379 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

CAACACAAGCCGGGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGGCGCAATGTG CGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAA CCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTTATATTCAGACTCAGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGT CCCCGGCGGCTCGCCCCGAGGGGGTTCCCCGCCGAAGCAACAGTGTTAGGTATTCACGGGTGGGAGGTTGGGCGCCC GGAGGCAGCCCGCACTCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGT

# Morfotaxon 17 - 372 pb (Consenso: $5' \rightarrow 3'$ )

CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAACTTACCAAAACACTGTTTTAGATTTATAAAACCCACCAGTTAAGTTCAA TTAAACAAAATATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTA TGACTTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTGGGGCATTCTCCAAGGCATGCCTGTTTGAGCGT GATTTCTTCTCACCGCCCAGGTGGTTTTGCATCCGCTAAATAACATATCCGCAGCGAAGTCTACGCTTTCACTGCACCATGC TATTTCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA

## Morfotaxon 19 - 364 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

GCATGGTGCAGTGAAAGCGTAGACTTCGCTGCGGATATGTTATTTAGCGGATGCAAAACCACCTGGGCGGTGAGAAGAAAT CACGCTCAAACAGGCATGCCTTGGAGAATGCCCCAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGTCTGCAAGTC ATACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTATATTTTGTTTAA TTGAACTTAACTGGTGGGTTTTATAAATCTAAAACAGTGTTTTGGTAAGTTTTTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGG AAACCTTGTTACGATTTTTACTTCCCACCTCTCAGG

## Morfotaxon 21 - 437 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

# Morfotaxon 25 - 374 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

TTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGTAAAGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACT ACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAACACCAAGCAGGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATG CCCGCCAGAATGCTGGCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCA TTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAA ACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCC

# Morfotaxon 31A - 494 pb (Consenso: $5' \rightarrow 3'$ )

CCGGCGCCACTACAAAAGCGAGAAGAAATTACTACGCTGAGAGTGAGCACGAACTCCGCCACTACTTTTAGGGAACTACGC TGTAACCCGTAGAATCCCAACGCTAAGCAACTGAGGCTTAAGGGTTGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAATA CTAATGGGCGCCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTC TTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAGTTATACGATTCAGAGATACAAAATAAAAAC AGAGTTTAGTGGTCCTCTGGCGAGCTTATAGCGTGCTCCCGGGTAGCTACAGGGTAGCTATAGGGTAGCACAGCTCGCCG AGGCAACAGTGGTAAGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTTTGGATAACTCAGTATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGA CCTTG

# Morfotaxon 31B - 469 pb (Consenso: $5' \rightarrow 3'$ )

GCGAGAAGAAATTACTACGCTGAGAGTGAGCACGAACTCCGCCACTACTTTTAGGGAACTACGCTGTAACCCGTAGAATCC CAACGCTAAGCAACTGAGGCTTAAGGGTTGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAATACTAATGGGCGCAATGTG CGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAAC CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAGTTATACGATTCAGAGATACAAAATAAAAACAGAGTTTAGTGGTCCTC TGGCGAGCTTATAGCGTGCTCCCGGGTAGCTACAGGGTAGCTATAGGGTAGCACAGCTCGCCGAGGCAACAGTGGTAAGT TCACAAAGGGTTGGGAGTTTTGGATAACTCAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGG

## Morfotaxon 34 - 474 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

GCCAGCGCCACTACAAAAGCGAGAAGAGATTACTACGCTGAGAGTGAGCACCAACTCCGCCACTATTTTTAGGGAACTACG CTGTAACCCGTAGAATCCCAACGCTAAGCAACTGAGGCTTAAGGGTTGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAAT ACTAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTCGCGCTG CTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAGTTATAAGATTCAGAGATACAAAATAAAAA CAGAGTTTAGTGGTCCTCTGGCGAGCCTATAGCGCGCTACGAGGTAGCACAGCTCGCCGAGGCAACAGCGGTAAGTTCAC AAAGGGTTGGGAGTTTGGATAACTCAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTT
## Morfotaxon 38 - 446 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

## Morfotaxon 39 - 478 pb (Reverse: $3' \rightarrow 5'$ )

CGAGAAGAGATTACTACGCTGAGAGTGAGCACCAACTCCGCCACTACTTTTAGGGAACTACGCTGTAACCCGTAGAATCCC AACGCTAAGCAACTGAGGCTTAAGGGTTGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCCACTAGAATACTAATGGGCGCAATGTGC GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAGTTATACGATTCAGAGATACAAAATAAAAACAGAGTTTAGTGGTCCTCT GGCGAGCTTATAGCGTGCTCCCGGGTAGCTACAGGGTAGCTATAGGGTAGCACAGCTCGCCGAGGCAACAGTGGTAAGTT CACAAAGGGTTGGGAGTTTTGGATAACTCAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTT