

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

ARETUSA CRISTINA FELBER

Transformação genética de fungos endofíticos *Diaporthe schini* isolados de *Vitis labrusca* e atividade antagonística em patógenos.

Maringá
2016

ARETUSA CRISTINA FELBER

Transformação genética de fungos endofíticos *Diaporthe schini* isolados de *Vitis labrusca* e atividade antagonística em patógenos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientadora: Dr^a. Káthia Socorro Mathias Mourão
Co-orientador: Dr. João Alencar Pamphile

Maringá
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

F312t Felber, Aretusa Cristina
Transformação genética de fungos endofíticos
Diaporthe schini isolados de *Vitis labrusca* e
atividade antagonística em patógenos / Aretusa
Cristina Felber. - - Maringá, 2016.
87 f. : il., figs.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Káthia Socorro Mathias
Mourão.
Co-orientador: Prof. Dr. João Alencar Pamphile.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual
de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa
de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2016.

1. Fungos endofíticos. 2. Transformação mediada
por *Agrobacterium*. 3. Controle biológico. 4.
Videira. 5. Proteínas fluorescentes. I. Mourão,
Káthia Socorro Mathias, orient. II. Pamphile, João
Alencar, co-orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Comparada. III. Título.

CDD 22. ed. 576

MGC 001428

FOLHA DE APROVAÇÃO

ARETUSA CRISTINA FELBER

Transformação genética de fungos endofíticos *Diaporthe schini* isolados de *Vitis labrusca* e atividade antagonística em patógenos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Káthia Socorro Mathias Mourão
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Hélio Conte
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Ravelly Casarotti Orlandelli
Universidade Estadual do Paraná

Aprovada em: 30 de agosto de 2016.

Local de defesa: Sala 214, Bloco G80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Ao meu pai Carlos, que me fez entender o
que realmente importa na vida.

Ofereço

Ao meu esposo Márcio, meu porto seguro.
À minha filha Alice, o Sol dos meus dias.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força e discernimento diante das dificuldades.

À Professora Dr^a. Káthia Socorro Mathias Mourão pela orientação, confiança e por sua contribuição para o meu crescimento profissional.

Ao Professor Dr. João Alencar Pamphile pela orientação, por seus ensinamentos, por sua dedicação e por seu incentivo à minha formação profissional.

Ao Dr. Carlos Labate e a Dr^a. Maria Carolina Quecine Verdi por fornecerem as linhagens utilizadas para a transformação genética.

À EMBRAPA Uva e vinho por fornecer as linhagens de fungos fitopatogênicos.

À Universidade Estadual de Maringá pela estrutura e suporte.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada pela dedicação aos discentes.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada por compartilharem seus conhecimentos e experiência.

À CAPES e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Aos técnicos de laboratório Donizete e Enilla pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LBIOMIC) Alessandra, Ravelly, Vânia, Júlio, Adriana, Juliana, Andressa, Priscila, Mariana, Tiago, Sandro, Vagner, Raiani, Caroline, Amanda, Ligia, Aline, Katiúscia, Angela e Shalene pela ajuda e companhia.

Às amigas Ravelly e Vânia pelo companheirismo e incentivo. À amiga Alessandra pelo auxílio, incentivo e paciência nos momentos de dificuldade.

À professora Dr^a. Eliane Papa Ambrosio Albuquerque pelo auxílio na captura das imagens de fluorescência.

Aos meus pais, Carlos e Célia, pelo apoio e compreensão. E aos meus irmãos, Amanda e Pedro Henrique, pela amizade e parceria.

Ao meu esposo Márcio pelo incentivo, parceria, compreensão, paciência e carinho.

À minha filha Alice por sempre me alegrar com seu sorriso.

Aos meus familiares e amigos por compreenderem a minha ausência.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“De modo suave, você pode sacudir o mundo”

Mahatma Gandhi

Transformação genética de fungos endofíticos *Diaporthe schini* isolados de *Vitis labrusca* e atividade antagonística em patógenos

RESUMO

A uva está entre as frutas mais consumidas no mundo, sendo a videira uma das mais antigas plantas cultivadas pelo homem. As doenças fúngicas causam muitos prejuízos na produção de uvas e exigem a utilização intensa de fungicidas químicos. Uma alternativa para minimizar a utilização de pesticidas e diminuir os impactos ambientais é a utilização de um controle integrado de doenças, como o uso de micro-organismos no controle biológico de patógenos. Os fungos endofíticos estabelecem uma íntima associação mutualística com os vegetais, colonizando o interior de seus órgãos e tecidos sem causar sintomas aparentes. Os endófitos são potencialmente úteis para a agricultura no controle biológico de doenças e pragas, isso se deve à sua capacidade de proteger a planta contra o ataque de herbívoros e fitopatógenos. O potencial biotecnológico dos endófitos tem estimulado pesquisas em relação aos mecanismos de interação endófito-hospedeiro. Um dos meios utilizados para o estudo dessa relação é a inserção de genes exógenos que produzem componentes celulares com emissão de fluorescência, permitindo a visualização direta dos micro-organismos sem a destruição das células. Muitos estudos têm demonstrado que a bactéria fitopatogênica *Agrobacterium tumefaciens*, frequentemente utilizada em procedimentos de transformação de plantas, é capaz de transferir parte do DNA (T-DNA) presente em seu plasmídeo Ti também para fungos. Endófitos de diversas espécies foram isolados de *Vitis labrusca* e apresentaram antagonismo *in vitro* frente a fitopatógenos da videira, dentre eles fungos do gênero *Diaporthe*. Este estudo teve por objetivos identificar em nível de espécie dois fungos endofíticos de videira pertencentes ao gênero *Diaporthe*, estabelecer uma metodologia de transformação genética para estes fungos mediada por *A. tumefaciens*, obtendo transformantes estáveis e rastreáveis no ambiente pela produção das proteínas fluorescentes verde e vermelha. Objetivou-se ainda a comparação da atividade antagonística em fungos patogênicos da videira dos transformados em relação à linhagem selvagem. As análises moleculares confirmaram a identidade dos dois fungos endofíticos como *Diaporthe schini* e foram obtidas altas frequências de transformação para estes fungos, 96 % com o plasmídeo pFAT-gfp para *D. schini* (B64-46) e 98 % com pCAMDsRed para *D. schini* (C27-07). Os transformantes mostraram-se resistentes à higromicina B e a presença do gene *hph* foi confirmada pela técnica de PCR. Eles também se apresentaram mitoticamente estáveis e expressando o fenótipo fluorescente, sendo que diferenças morfológicas nas colônias em relação às linhagens selvagens puderam ser notadas. Testes de antagonismo *in vitro* dos transformantes em fungos fitopatogênicos da videira não apresentaram variação na atividade antagonística em relação à linhagem selvagem. A transformação genética de *D. schini* mediada por *A. tumefaciens* demonstrou ser uma técnica eficiente na inserção aleatória de genes repórteres para o monitoramento da linhagem no ambiente.

Palavras-chave: Transformação mediada por *Agrobacterium*. Fungos endofíticos. Proteínas fluorescentes. Videira. Controle biológico.

Genetic transformation of endophytic fungi *Diaporthe schini* isolated from *Vitis labrusca* and antagonistic activity in pathogens

ABSTRACT

Grape is among the most consumed fruits in the world, and the grapevine is one of the oldest plants cultivated by man. Fungal diseases cause many losses in the grapes production and require intensive use of chemical fungicides. An alternative to minimize the use of pesticides and reduce the environmental impacts is the utilization of integrated control of diseases, as the biological control of pathogens by microorganisms. Endophytic fungi establish an intimate mutualistic association with plants, colonizing the interior of young organs and tissues without causing apparent symptoms. Endophytes are potentially useful for agriculture in the biological control of pests and diseases, this is due to its ability to protect the plant against the attack by herbivores and pathogens. The biotechnological potential of endophytes has stimulated researches on the mechanisms of endophyte-host interaction. One methodology used for the study this relationship is the insertion of exogenous genes that produce cellular components with fluorescence emission, allowing the direct visualization of microorganisms without destruction of the cells. Many studies have shown that the phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens*, frequently used in plant transformation procedures, is able to transfer part of the DNA (T-DNA) present in its Ti plasmid for fungi. Endophytes of several species were isolated from *Vitis labrusca* and showed antagonism *in vitro* against phytopathogens of the grapevine, among them fungi of the genus *Diaporthe*. This study aimed to identify at species level two endophytes fungi of grapevine of the genus *Diaporthe*, establish a genetic transformation methodology for these fungi mediated by *A. tumefaciens*, getting transformants stable and traceable in the environment by production of green and red fluorescent proteins. Another objective is the comparison of antagonistic activity in pathogenic fungi of grapevine of the transformants in relation to the wild type. Molecular analyzes confirmed the identity of the two endophytic fungi as *Diaporthe schini* and high transformation frequencies were obtained, 96 % with the pFAT-gfp plasmid for *D. schini* (B64-46) and 98 % with pCAMDsRed for *D. schini* (C27-07). The transformants showed to be resistant to hygromycin B and the presence of the *hph* gene was confirmed by PCR. They also presented mitotically stable, expressing the fluorescent phenotype, with morphological differences in the colonies in relation to the wild types. *In vitro* antagonism tests of the transformants against phytopathogens fungi from grapevine demonstrated no variation in the antagonistic activity when compared to the wild type. Genetic transformation of *D. schini* mediated by *A. tumefaciens* proved to be an efficient technique for random insertion of reporter genes for monitoring the strain on the environment.

Keywords: *Agrobacterium*-mediated transformation. Endophytic fungi. Fluorescent proteins. Grapevine. Biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1** Cladograma resultante da análise Bayesiana do alinhamento de três genes combinados (ITS, TEF1 e TUB). As probabilidades Bayesianas são demonstradas nos nós entre cada indivíduo. As sequências de *Diaporthe rhoïna* CBS 146.27 foram utilizadas como grupo externo.....67
- Fig. 2** Determinação da concentração mínima de higromicina B capaz de inibir o crescimento de *Diaporthe schini*. **a** Colônia de *D. schini* (B64-46) em meio BDA, **b** em meio BDA contendo 5 µg/mL de higromicina B e **c** ausência de crescimento micelial em meio BDA com 25 µg/mL de higromicina B. **d** Colônia de *D. schini* (C27-07) em meio BDA, **e** em meio BDA contendo 5 µg/mL de higromicina B e **f** ausência de crescimento micelial de *D. schini* (C27-07) em meio BDA com 25 µg/mL de higromicina B.....68
- Fig. 3** Colônias de transformantes de *Diaporthe schini* cultivados em BDA suplementado com 25 µg/mL de higromicina B e incubados a 28 °C por 7 dias. **a** Colônia da linhagem selvagem de *D. schini* (B64-46). **b-k** Fenótipos de transformantes de *D. schini* (B64-46) portadores do gene *gfp*, GFP 1 a 10. **l** Colônia da linhagem selvagem de *D. schini* (C27-07). **m-v** Fenótipos de transformantes de *D. schini* (C27-07) portadores do gene *DsRed-Express*, DsRed 1 a 10.....69
- Fig. 4** Expressão das proteínas GFP e DsRed em *Diaporthe schini*. **a** Micélio de *D. schini* (B64-46) em campo claro e **b** em fluorescência. **c, d** Transformantes *D. schini* (B64-46) com expressão da fluorescência verde. **e** Micélio de *D. schini* (C27-07) em campo claro e **f** em fluorescência. **g, h** Transformantes *D. schini* (C27-07) com expressão da fluorescência vermelha. Bar = 10 µm.....70
- Fig. 5** Produtos da amplificação de um fragmento do gene *hph* com aproximadamente 600 pb utilizando os *primers* hph 1 e hph 2. **a** 1 DNA *ladder* 1 kb; 2 a 11 transformantes contendo o plasmídeo pFAT-gfp; 12 fungo selvagem *Diaporthe schini* (B64-46). **b** 1 DNA *ladder* 1 kb; 2 a 11 transformantes contendo o plasmídeo pCAMDsRed; 12 fungo selvagem *D. schini* (C27-07).....71
- Fig. 6** Atividade antagonística das linhagens selvagens de *Diaporthe schini* e seus transformantes à fungos fitopatogênicos da videira. Antagonismo ao patógeno *Alternaria* sp. (CNPUV 674) (à direita nas placas): **a** *D. schini* (B64-46) (IA=35,96 %), **b** transformante GFP 4 (IA=37,44 %), **c** *D. schini* (C27-07) (IA=37,64 %) e **d** transformante DsRed 7 (IA=40,87 %). Antagonismo ao patógeno *Glomerella* sp. (CNPUV 378) (à direita nas placas): **e** *D. schini* (B64-46) (IA=39,45 %), **f** transformante GFP 4 (IA=52,35 %), **g** *D. schini* (C27-07) (IA=38,28 %) e **h** transformante DsRed 7 (IA=44,25 %)......72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* isolados das cultivares de videira Bordô e Concord e sequências com maior identidade quando alinhadas no banco de dados do GenBank (NCBI).....64
- Tabela 2.** Atividade antagonística do fungo endofítico *Diaporthe schini* (B64-46) e seus transformantes contendo o gene *gfp* em relação à fungos fitopatogênicos da videira.....65
- Tabela 3.** Atividade antagonística do fungo endofítico *Diaporthe schini* (C27-07) e seus transformantes contendo o gene *DsRed-Express* em relação à fungos fitopatogênicos da videira.....66

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
Introdução	13
Revisão Bibliográfica	15
2.1 Vitivinicultura	15
2.2 O gênero <i>Vitis</i>	16
2.3 Fungos endofíticos	18
2.4 Potencialidades dos fungos endofíticos no controle biológico	20
2.5 Interação micro-organismo-planta e ferramentas empregadas no seu estudo.....	22
2.6 Transformação genética de fungos: aspectos básicos	24
2.7 Transformação genética de fungos mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
2.8 O gênero <i>Diaporthe</i>	27
Referências	30
CAPÍTULO 2	40
Transformação genética de fungos endofíticos <i>Diaporthe schini</i> isolados de <i>Vitis labrusca</i> e atividade antagonística em patógenos	41
ANEXO	73

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

O cultivo da videira é uma atividade antiga de importância mundial que alcança cerca de 77 milhões de toneladas de uvas produzidas anualmente (FAOSTAT, 2015), com expectativas de que a demanda mundial da fruta aumente acompanhando o crescimento populacional. As uvas são destinadas ao consumo *in natura*, produção de vinhos, sucos (MELLO, 2013), passas e doces (LEÃO, 2000).

As espécies importantes para a agricultura são *Vitis labrusca* e *V. vinifera* (SOUZA, 1996). Cultivares de *V. labrusca*, denominadas uvas rústicas ou americanas, possuem aroma e sabor marcantes e apresentam alta produtividade e grande resistência às doenças (CAMARGO; MAIA, 2005). Já as uvas finas de mesa, pertencentes à espécie *V. vinifera*, destacam-se pela qualidade de seus frutos e fineza de seus vinhos (GIOVANNINI, 2014).

Os problemas mais graves associados ao cultivo de videiras são as doenças fúngicas, que causam perdas na produção e na qualidade dos frutos (FAN et al., 2008). Por isso, o desenvolvimento de cultivares resistentes às doenças e métodos mais eficazes de controle de patógenos são fundamentais para a cadeia produtiva de uvas (CAMARGO et al., 2010). Nesse contexto, o controle biológico pode ser uma alternativa aos pesticidas, já que estes produtos químicos podem causar a contaminação ambiental e humana (BUTT et al., 2001).

Os fungos endofíticos, micro-organismos que habitam o interior das plantas de forma assintomática (PETRINI, 1991), podem ser utilizados no controle biológico de doenças por colonizarem um nicho ecológico semelhante àquele ocupado pelos fitopatógenos (ARAÚJO et al., 2010). Diversos estudos apresentaram resultados promissores utilizando endófitos no biocontrole de patógenos da viticultura (MUSSETI et al., 2006; BURRUANO et al., 2008; BRUM et al., 2012; FELBER et al., 2016). Porém, investigações relacionadas às interações entre endófitos e a videira *in vivo* são escassas.

A complexidade acerca da interação entre endófitos e plantas tem direcionado estudos com enfoque na investigação de padrões de colonização, forma de penetração e transferência destes micro-organismos nas plantas (ARAÚJO et al., 2010). A técnica mais adotada para monitorar eventos em tempo real dentro de células vivas é a microscopia de fluorescência (SPRING, 2003). Mas sua utilização demanda que o espécime a ser analisado seja capaz de fluorescer, o que pode ser obtido com a utilização de fluoróforos, como as proteínas auto fluorescentes verde (GFP) e vermelha (DsRed) (LARRAINZAR et al., 2005).

Os genes repórteres responsáveis pela produção das proteínas fluorescentes podem ser inseridos no genoma de fungos filamentosos por meio de diferentes técnicas, como a mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria de solo causadora de tumores em plantas (DE GROOT et al., 1998). As vantagens desse método estão na facilidade de execução, alta eficiência de transformação e inserção única do material genético no genoma do hospedeiro (FITZGERALD et al., 2003).

Os fungos do gênero *Diaporthe* (= *Phomopsis*) compõem um grupo economicamente importante de fitopatógenos causadores de doenças em uma ampla gama de culturas (CROUS, 2005; UDAYANGA et al., 2011), acarretando o apodrecimento de frutos e raízes, cancrs, manchas foliares, murcha entre outros (UECKER, 1988; MOSTERT et al., 2001; THOMPSON et al., 2011). Porém, também podem ser encontrados como endófitos em diversas espécies de plantas, sendo referido como gênero mais frequente em alguns hospedeiros (MURALI et al., 2006; BOTELLA; DIEZ, 2011). Esses fungos têm sido relatados na literatura como produtores de metabólitos secundários (ISAKA et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2003), causadores de redução na herbivoria (VESTERLUND et al. 2011) e aplicados como bioherbicidas (ASH et al., 2010).

Fungos endofíticos de diversos gêneros foram isolados de folhas das videiras Bordô e Concord (*Vitis labrusca* L.), com vários destes apresentando atividade antagonística *in vitro* a fungos fitopatogênicos da videira (FELBER et al., 2016), incluindo isolados do gênero *Diaporthe*. Portanto, o presente trabalho teve por objetivos:

1. Identificar em nível de espécie dois fungos endofíticos de videira pertencentes ao gênero *Diaporthe*;
2. Estabelecer uma metodologia de transformação genética para estes fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*;
3. Obter transformantes estáveis e rastreáveis no ambiente pela expressão dos genes produtores das proteínas fluorescentes verde e vermelha (*gfp* e *DsRed-Express*);
4. Comparar a atividade antagonística dos transformantes frente a fungos fitopatogênicos da videira em relação à linhagem selvagem.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Vitivinicultura

A uva é uma das frutas mais consumidas no mundo. Em 2013, a área cultivada mundialmente com videiras foi de aproximadamente 7 milhões de hectares e a produção de uvas ultrapassou 77 milhões de toneladas. O maior produtor foi a China, seguido de Itália, Estados Unidos, Espanha e França. O Brasil não está entre os maiores produtores desta fruta, porém o seu cultivo foi expressivo, totalizando 1,4 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015).

A vitivinicultura tornou-se uma atividade importante para a sustentabilidade de pequenas propriedades brasileiras, bem como na geração de emprego em grandes empreendimentos que produzem uvas de mesa e uvas para processamento (MELLO, 2011). Em 2012, a área cultivada com videiras no Brasil foi de aproximadamente 82.500 hectares, concentrada nos estados de Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Minas Gerais. Nesse mesmo ano a produção foi de 1.455.809 toneladas, com 57,07 % destinada ao processamento (vinhos, sucos e derivados) e 42,93 % ao consumo *in natura*. Os estados maiores produtores de sucos e vinhos do país, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, somaram mais de 600 milhões de litros (MELLO, 2013).

Segundo Radmann e Bianchi (2008) a uva é considerada a fruta de domesticação mais antiga de que se tem conhecimento. As primeiras evidências da produção de vinhos foram encontradas no Irã há cerca de 7.000 a. C. A videira foi disseminada inicialmente na Região Mediterrânea sendo introduzida nas Américas pelos colonizadores espanhóis e portugueses (MCGOVERN, 2003). No Brasil, as primeiras variedades foram uvas finas da espécie *Vitis vinifera* trazidas pelos portugueses. A consolidação da viticultura brasileira deu-se em meados do século XIX, com a introdução da cultivar de uva americana Isabel (*Vitis labrusca*) pelos imigrantes italianos.

Atualmente o setor vitivinícola brasileiro é bastante diverso, com uvas finas, americanas e híbridas para mesa, uvas para elaboração de vinhos finos, e uvas americanas e híbridas para a elaboração de vinhos de mesa e sucos (CAMARGO et al., 2010). As uvas de mesa brasileiras apresentam certo privilégio no mercado internacional de frutas *in natura*, isso é alcançado graças aos vários ciclos de produção que o país pode ter dentro de um mesmo ano, possibilitando que parte da produção brasileira alcance o mercado internacional quando não existe mais uva em outros países (CORRÊA; BOLIANI, 2001).

Com a rápida expansão da população mundial, é necessário aumentar a produção e distribuição de alimentos e isto precisa ocorrer em meio às mudanças climáticas e sem a expansão da área cultivada existente. Além disso, deve-se considerar o impacto que os fungos fitopatogênicos exercem sobre a produção agrícola, ocasionando enormes prejuízos (MULLINS; KANG, 2001). As doenças fúngicas representam o problema mais grave enfrentado no cultivo da videira, pois os patógenos causam perdas na produção e na qualidade dos frutos (FAN et al., 2008).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (= *Glomerella cingulata*) causa a doença conhecida como podridão da uva madura. Ela leva ao apodrecimento das bagas maduras ou em processo de amadurecimento causando perdas expressivas na produção de uvas para processamento (GARRIDO et al., 2004).

A requeima das folhas da videira é também uma doença fúngica provocada por *Alternaria alternata*. Os sintomas iniciais são pontuações escuras que progridem para manchas necróticas cobrindo quase todo o limbo foliar e causando a queda prematura das folhas (SÔNEGO et al., 2005). Esse fungo também está associado às podridões secundárias ainda no campo ou durante o transporte e armazenamento das uvas, provocando lesões e perda de consistência das bagas (DIAS et al., 1998).

As condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de doenças encontradas em determinadas regiões levam a gastos com tratamentos fitossanitários que podem atingir 30 % do custo da produção de uvas (SÔNEGO et al., 2005) e a perdas de 20 a 80 % na produtividade (DIAS et al., 1998). Assim, o desenvolvimento de novas formas de diagnosticar, prever e restringir as doenças tornou-se um desafio constante para a ciência da patologia vegetal (MULLINS; KANG, 2001).

O desenvolvimento de cultivares de videira resistentes às doenças é uma necessidade comum em todos os segmentos da cadeia produtiva de uvas. Deste modo, o melhoramento genético pode contribuir com o desenvolvimento destas cultivares ou a incorporação de resistência às doenças por meio de biotecnologias como a Engenharia Genética (CAMARGO et al., 2010).

2.2.O gênero *Vitis*

A videira pertence ao clado Angiospermae, Classe Eudicotidae, Ordem Vitales e Família Vitaceae (APG III, 2009). É um arbusto com caule sarmentoso e trepador, que se fixa a suportes por meio de órgãos especializados conhecidos como gavinhas. Seu sistema radicular

se desenvolve no subsolo durante toda a vida da planta, enquanto o sistema aéreo é constituído por um tronco, braços, sarmentos, folhas, frutos e gavinhas, com vida útil inferior a um ano. Seu ciclo anual compreende quatro períodos: mobilização de substâncias de reservas, crescimento de todos os órgãos, acúmulo de reservas e dormência (HIDALGO, 2002).

Vitis, um dos 14 gêneros de Vitaceae composto por cerca de 900 espécies (SOEJIMA; WEN, 2006), possui importância econômica, social e histórica incomparavelmente maior em relação a qualquer outro gênero da família. Esse gênero divide-se em dois subgêneros: *Muscadinea* e *Euvitis*. Neste último encontram-se espécies de videiras verdadeiras, como as espécies de grande importância para a agricultura, *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* (SOUZA, 1996).

Uvas da espécie *Vitis labrusca* L., como as cultivares Bordô e Concord, são denominadas rústicas ou americanas e apresentam alta produtividade e grande resistência às doenças. Podem ser consumidas *in natura* ou processadas como vinhos e sucos. Possuem características de sabor e aroma determinantes na preferência dos consumidores (CAMARGO; MAIA, 2005).

As uvas finas de mesa englobam variedades da espécie *Vitis vinifera* L. de origem europeia (LEÃO, 2004), que se destaca pela qualidade de seus frutos e fineza de seus vinhos, sendo a principal espécie utilizada na elaboração de vinhos e seus derivados, para consumo *in natura* e para a produção de passas (GIOVANNINI, 2014). Além da sua importância econômica apresenta alta diversidade morfológica e genética, e a facilidade de propagação assexual originou um número estimado em 14.000 cultivares, aproveitadas em diferentes finalidades: consumo *in natura*, passas, sucos e vinhos (ALLEWELDT et al., 1990). Porém, esse número é ampliado ano a ano como resultado de diversos programas de melhoramento genético em andamento em vários países (LEÃO, 2010).

A avaliação da qualidade das uvas de mesa leva em consideração principalmente: o formato, tamanho e compacidade do cacho; tamanho, forma, resistência e cor da baga; presença ou não de sementes; e qualidade gustativa, expressa principalmente pela relação açúcar/acidez e pelas substâncias aromáticas da uva (MIELE et al., 2000). E apesar das qualidades apresentadas pelas videiras da espécie *Vitis vinifera* L., que as torna amplamente utilizadas em trabalhos de melhoramento genético, seu cultivo é limitado por apresentar sensibilidade às moléstias fúngicas como míldio (*Plasmopora viticola*) e oídio (*Uncinula necator*), que elevam os custos da sua produção (GIOVANNINI, 2014).

2.3. Fungos endofíticos

Os fungos são organismos eucarióticos que podem se apresentar sob a forma de leveduras, formando um pseudomicélio ou constituindo hifas. Estão presentes em qualquer nicho ecológico, compondo um grupo diversificado e muito grande, com estimativa de que existam cerca de 1,5 milhões de espécies (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Quando associados às plantas, os fungos podem ser considerados endofíticos, epifíticos ou fitopatogênicos, dependendo do nicho ocupado em determinado estágio da interação com o seu hospedeiro (STROBEL et al., 2004).

São denominados endófitos, de modo geral, os micro-organismos que habitam o interior das plantas de forma assintomática ao menos por um período do seu ciclo de vida (PETRINI, 1991; WILSON, 1995; BACON; WHITE, 2000; SCHULZ et al., 2002). Azevedo e Araújo (2007) definem como endófitos todos os micro-organismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar prejuízo ao hospedeiro, e sem desenvolver estruturas externas visíveis. Mendes e Azevedo (2007) ampliaram esta definição dividindo os endófitos em dois tipos: endófitos do tipo I, que não produzem estruturas externas à planta hospedeira e do tipo II, que desenvolvem estruturas externas à planta como fungos micorrízicos e bactérias simbiotes fixadoras de nitrogênio.

A primeira descrição dos endófitos foi feita por Bary em 1866, porém durante mais de um século eles permaneceram ignorados por se conhecer muito pouco sobre suas reais funções no interior dos vegetais (PEIXOTO NETO et al., 2002). Os endófitos adquiriram importância somente no final dos anos 70, após a descoberta de sua relação simbiótica com as plantas e sua capacidade de protegê-las (AZEVEDO, 1999). A partir de então, esses organismos foram encontrados em todas as espécies de plantas examinadas, sendo considerados ubíquos (ARNOLD; LUTZONI, 2007; RODRIGUEZ et al., 2009). E os crescentes estudos permitiram desvendar que na associação endófito-hospedeiro o micro-organismo se beneficia com nutrição e proteção contra estresses abióticos (BACON; HILL, 1996), enquanto a planta adquire proteção contra patógenos e herbívoros por meio de alcalóides tóxicos produzidos na associação simbiótica (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Na maioria dos vegetais, a penetração dos endófitos ocorre através de aberturas naturais ou artificiais, como estômatos, região de emissão de raízes secundárias, ferimentos causados por instrumentos agrícolas ou pelo atrito das raízes com partículas do solo (HALLMANN et al., 1997). Alguns endófitos possuem estruturas especializadas para adentrar o tecido vegetal como haustórios e apressórios (STONE et al., 1994), outros penetram por meio da secreção de

enzimas hidrolíticas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Os fungos endofíticos podem ainda ser transmitidos a partir de hifas crescendo em sementes (SAIKKONEN et al., 1998) que, após a germinação, colonizam outras partes da planta, como é o caso das gramíneas (PEIXOTO NETO et al., 2002).

O número de espécies de fungos endofíticos pode variar de acordo com a espécie vegetal, o local onde o endófito se instala e a fase de desenvolvimento da planta (OKI et al., 2008). Geralmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isoladas a partir de uma única planta, sendo que pelo menos uma é específica ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001).

Fungos endofíticos podem ser detectados por meio da desinfecção superficial de órgãos e tecidos do hospedeiro, seguida de um processo de isolamento dos micro-organismos em meio de cultura adequado (SCHULZ; BOYLE, 2005). Pesquisas indicaram que as amostras de folhas abrigam um maior número de espécies de fungos endofíticos por apresentarem menos barreiras de infecção (ARNOLD; LUTZONI, 2007). Porém, o isolamento dos endófitos também pode ser realizado a partir de raízes, caules, ramos, sementes e estruturas florais como pólen, ovário, anteras e estames (ARAÚJO et al., 2010).

A maioria dos fungos endofíticos isolados de plantas são ascomicetos ou seus anamorfos, com menos relatos de endófitos basidiomicetos (NAIR; PADMAVATHY, 2014). Os endófitos são classificados em dois grupos, com base na filogenia e história de vida, os clavicipitaceus (C) que infectam algumas gramíneas e os não-clavicipitaceus (NC-endófitos), que podem ser recuperados de tecidos assintomáticos de plantas não vasculares, samambaias, coníferas e angiospermas (RODRIGUEZ et al., 2009).

Estudos revelam uma diversidade cada vez maior de micro-organismos endofíticos (OKI et al., 2008) e diversos trabalhos têm mostrado o potencial dos endófitos no controle biológico de doenças e pragas, e na promoção de crescimento da planta hospedeira. Muitos endófitos já foram descritos como produtores de compostos antimicrobianos, anticancerígenos e de enzimas de interesse biotecnológico, e outros vêm sendo utilizados na biorremediação de poluentes (ARAÚJO et al., 2010).

Na investigação da micota endofítica de videiras a maioria dos estudos se concentra em fungos associados às uvas finas de mesa da espécie *Vitis vinifera* (MOSTERT et al., 2000; BURRUANO et al., 2008; CASIERI et al., 2009; GONZÁLES; TELLO, 2011; PANCHER et al., 2012). Pesquisas relacionadas à bioprospecção de fungos endofíticos na espécie *Vitis labrusca* objetivaram também a avaliação do potencial dos endófitos no controle de fungos patogênicos da videira (BRUM et al. 2012; FELBER et al., 2016).

Nos últimos anos têm-se visto o grande interesse dos pesquisadores pelos micro-organismos endofíticos, graças aos métodos mais fáceis de isolamento e identificação e ferramentas atuais de biologia molecular. E devido à sua grande importância para as plantas, seres humanos e meio ambiente, os cientistas começaram a explorá-los muito na busca por novos compostos e novas aplicações para o homem e o meio ambiente (NAIR; PADMAVATHY, 2014).

2.4. Potencialidades dos fungos endofíticos no controle biológico

A base do controle de doenças, pragas e plantas invasoras é principalmente a pulverização de culturas com uma grande quantidade de pesticidas químicos sintéticos (COOK, 2000). É reconhecido que alguns destes pesticidas contaminam os lençóis freáticos e entram nas cadeias alimentares causando impacto sobre uma ampla gama de organismos (BUTT et al., 2001). Assim, espécies importantes para o ambiente, como insetos e micro-organismos que controlam e inibem a multiplicação dos organismos prejudiciais também podem ser eliminadas (AZEVEDO et al., 2000).

Os pesticidas representam riscos para a saúde animal e para o usuário na pulverização do produto químico. Portanto, a percepção dos consumidores em todo o mundo é de que uso de produtos químicos na produção agrícola precisa ser significativamente reduzido. Para satisfazer essa demanda, estratégias de controle biológico, especialmente para o crescente mercado de orgânicos, são urgentemente necessárias (BUTT et al., 2001).

O controle biológico é a redução da quantidade de inóculo ou da atividade de produção de doença de um patógeno realizada por ou através de um ou mais organismos com exceção do homem (COOKE; BAKER, 1983). Até o século XX pouco se conhecia sobre a ação de micro-organismos no controle de fitopatógenos além de técnicas que envolviam o manejo do solo para o favorecimento de alguns micro-organismos que reduziam a incidência de doenças em raízes. Somente na década de 1970 foi que se criou a base conceitual e científica sobre o método de controle microbiano de doenças de plantas. O uso de agentes de biocontrole encontra-se bem difundido em diversos países (LOPES, 2009).

Enquanto existem fungos conhecidos por causarem diversas doenças nas plantas podendo devastar culturas, existem outros conhecidos como antagonistas de patógenos de plantas (THORN, 1997). No controle biológico, antagonistas são as espécies utilizadas para suprimir o patógeno de uma planta-alvo e são definidos como agentes biológicos com potencial

para interferir nos processos vitais dos patógenos de plantas, sendo equivalentes aos inimigos naturais (TJAMOS et al., 2010).

Uma das alternativas mais utilizadas no controle biológico é a introdução de inimigos naturais nas culturas para reduzir a população de agentes patogênicos. A base ecológica está no princípio de que muitas populações são limitadas no seu habitat natural pela ação de organismos de níveis tróficos superiores ou, no caso de alguns patógenos de plantas, por concorrentes dentro do mesmo nível trófico (HAJEK, 2004).

Os micro-organismos endofíticos podem ser utilizados no controle biológico de doenças por colonizarem um nicho ecológico semelhante àquele ocupado pelos fitopatógenos. Este controle pode ocorrer principalmente devido à atuação direta sobre o patógeno no interior da planta hospedeira, por antagonismo, por indução de resistência sistêmica e/ou por competição por nutrientes (ARAÚJO et al., 2010).

Na indução de resistência sistêmica o endófito, após penetrar ativamente na planta, induz a mesma a produzir compostos que atuam sobre o patógeno ou alteram a morfologia vegetal, podendo aumentar a parede celular por deposição de lignina e glucanas, aumentar a espessura da cutícula, além de sintetizar fitoalexinas, que dificultam a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento na planta hospedeira (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Para ser utilizado como controlador biológico, o endófito precisa apresentar boa colonização e bom índice de crescimento, combinados com antibiose (MEJÍA et al., 2008). Portanto, podem ser realizados teste *in vitro* ou *in vivo* para selecionar micro-organismos antagonísticos para aplicação em programas de controle biológico (MARIANO, 1993).

Trabalhos focados na utilização de endófitos no biocontrole de patógenos da viticultura vêm sendo realizados. Musseti et al. (2006) observaram a inibição da esporulação do fungo *Plasmopora viticola*, causador do míldio da videira, pelo endófito *Alternaria alternata* isolado de folhas de videira (*V. vinifera*). O mesmo pôde ser observado por Burruano et al. (2008) analisando a interação entre o endófito *Acremonium byssoides*, isolado de folhas da mesma espécie vegetal, e esse patógeno. Eles também verificaram a inibição da esporulação de *P. viticola* pelo extrato bruto obtido do endófito.

Brum et al. (2012) avaliaram fungos endofíticos de Niágara Rosada (*Vitis labrusca*) em experimento de cultura pareada contra o fungo patogênico da videira *Fusarium oxysporum* e observaram que 52 % dos endófitos foram capazes de inibir o crescimento do patógeno, com destaque para os isolados identificados como *Colletotrichum gloeosporioides* e *Flavodon flavus*.

Utilizando fungos isolados da mesma espécie vegetal e também em experimento de cultura pareada, Felber et al. (2016) observaram que a totalidade dos endófitos apresentou algum grau de inibição à fitopatógenos da videira. Dentre os fungos identificados molecularmente destacam-se *Phoma* sp. com 47,85 % de inibição ao crescimento do patógeno *Alternaria* sp., *Fusarium culmorum* com 44,36 % de inibição a *Sphaceloma* sp. e Sordariomycetes com 65,72 % frente a *Glomerella* sp. Fungos do gênero *Diaporthe* também apresentaram resultados promissores no controle desses fitopatógenos, os isolados *Diaporthe* sp. B64-46 e C27-07 inibiram, respectivamente, 31,67 % e 30,82 % o crescimento de *Alternaria* sp., 43,57 % e 33,65 % de *Sphaceloma* sp. e 47,70 % e 63,65 % de *Glomerella* sp.

2.5. Interação micro-organismo-planta e ferramentas empregadas no seu estudo

Acredita-se que todas as espécies de plantas que vivem em ecossistemas naturais estabelecem algum tipo de associação simbiótica com fungos (RODRIGUEZ et al., 2009). As interações endófito-planta parecem ter surgido há centenas de milhões de anos com o aparecimento dos vegetais superiores no planeta, resultando em processos coevolutivos (STROBEL et al., 1996). Os mecanismos envolvidos nesta relação não são bem compreendidos, mas se sabe que as interações endófito-hospedeiro podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (KOGEL et al., 2006).

Para Schulz e Boyle (2005) não existem interações neutras e a colonização assintomática consiste em um equilíbrio de antagonismos entre o endófito e o hospedeiro. Existe sempre pelo menos um grau de virulência por parte do fungo possibilitando a infecção, enquanto a defesa da planta hospedeira limita o desenvolvimento do fungo invasor e, conseqüentemente, da doença. Os endófitos experimentam relações simbióticas de longo prazo com suas plantas hospedeiras e muitos deles podem produzir substâncias bioativas como parte destes relacionamentos. Eles vivem no mesmo habitat e por meio da longa convivência e do contato direto, trocam material genético (WANG; DAI, 2011).

O mesmo micro-organismo endofítico pode ser capaz de colonizar vários hospedeiros, mas suas interações podem demonstrar especificidades funcionais ou ecológicas, ou seja, o endófito não interage com ambos os hospedeiros da mesma maneira (AGRIOS, 2005). Uma ou duas espécies de endófitos costumam predominar em um hospedeiro, enquanto outras se apresentam em menor frequência de colonização (CARROLL; CARROLL, 1978; ARNOLD et al., 2003).

Os fungos endofíticos podem colonizar seu hospedeiro de forma variada, de acordo com sua interação: 1) crescimento ativo dentro da planta, com colonização de forma extensa; 2) crescimento ativo dentro da planta, porém a colonização se limita a determinadas áreas do tecido vegetal; 3) pouco crescimento dentro da planta, permanecendo quiescente até a senescência do hospedeiro e 4) pouco crescimento dentro da planta, conservando-se metabolicamente ativos (RODRIGUEZ; REDMAN, 1997). A colonização dos endófitos pode ser intracelular e limitada a uma única célula, intercelular e localizada, intra e intercelular sistêmica (STONE et al., 2000), enquanto a disseminação dos fungos e bactérias para as diversas partes da planta ocorre de maneira sistêmica, habitando de forma ativa o apoplasto e os vasos condutores (HALLMANN et al., 1997).

A complexidade acerca da interação entre endófitos e plantas tem direcionado estudos com enfoque na investigação de padrões de colonização, forma de penetração e transferência destes micro-organismos nas plantas. Os endófitos podem ser observados diretamente em tecidos de plantas por meio de microscopia óptica, eletrônica ou de fluorescência, ocupando espaços intercelulares e intracelulares, além do interior de tecidos vasculares (ARAÚJO et al., 2010).

Para monitorar eventos em tempo real dentro de células vivas, a microscopia de fluorescência tem sido a técnica mais adotada. A função básica do microscópio óptico de fluorescência (MOF) é irradiar a amostra com o comprimento de onda desejado e depois separar a luz emitida por ela, que é muito mais fraca (fluorescente), da luz de excitação. Assim, apenas a luz de emissão deve chegar ao olho ou outro detector, de modo que as áreas fluorescentes resultantes contrastem com um fundo escuro (SPRING, 2003).

A utilização da análise em MOF demanda que o espécime a ser analisado seja capaz de fluorescer, isso pode ser obtido com a utilização de fluoróforos, que podem ser corantes, sondas de DNA associadas à fluoróforos, ou moléculas protéicas produzidas pelo próprio espécime. Sendo a última uma das principais estratégias no estudo de linhagens marcadas *in situ* (LARRAINZAR et al., 2005).

A primeira proteína auto fluorescente descoberta e mais amplamente estudada emite luz verde e foi designada *green fluorescent protein* (GFP) (LARRAINZAR et al., 2005). Ela foi encontrada na década de 1960 por Shimomura et al. (1962) na água-viva do Noroeste do Pacífico, *Aequorea victoria*. Pesquisando outras espécies de coral da classe Anthozoa, Matz et al. (1999) isolaram do coral Indo-Pacífico *Discosoma striata* a *red fluorescent protein* (DsRed), que emite luz vermelha. A vantagem da utilização destas proteínas se deve à alta estabilidade e por demandarem apenas de luz UV, ou luz azul, e oxigênio para emissão da fluorescência

(LORANG et al., 2001). Além disso, não necessitam de substrato exógeno e não afetam o tecido examinado, sendo marcadores ideais para estudar interações entre fungos e plantas (MAOR et al., 1998).

Trabalhos que utilizaram as proteínas fluorescentes GFP e DsRed ressaltam também como vantagem o fato de que estes marcadores não afetam a morfologia dos fungos, além de não afetarem a patogenicidade dos transformados. Porém, pequenas modificações em relação à taxa de crescimento micelial e pigmentação das colônias podem ocorrer em isolados transformados, considerando alterações no meio e condições de cultivo (PEDROZO, 2009).

O primeiro estudo envolvendo a expressão da GFP foi a transformação genética do fungo filamentosso *Ustilago maydis*, para avaliar a interação deste fitopatógeno com o milho (SPELLIG et al., 1996). Já a proteína DsRed foi utilizada pela primeira vez para a transformação de fungos filamentosos em um estudo envolvendo *Penicillium paxilli*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virens*, com objetivo de investigar sua capacidade para atuar como uma proteína repórter em ascomicetos e também a dupla rotulagem de fungos filamentosos com DsRed e GFP em estudos da interação entre fungos (MIKKELSEN et al., 2003).

2.6. Transformação genética de fungos: aspectos básicos

Além de modificar o hospedeiro em nível genético, fisiológico e ecológico (LUCERO et al., 2006), os fungos endofíticos também podem ser alterados geneticamente com objetivo de introduzir características de interesse nas plantas hospedeiras (PAMPHILE et al., 2004).

A transformação genética é um processo que permite a inserção de fragmentos de DNA exógeno em células hospedeiras para alterar o genótipo do organismo receptor e/ou promover a expressão do DNA exógeno. Ocorre em três etapas principais: indução da competência da célula hospedeira, introdução do DNA exógeno e seleção das células transformadas (MULLINS; KANG, 2001).

Na manipulação genética molecular de micro-organismos faz-se necessário um sistema de transformação mediada por plasmídeo que abrange a introdução do DNA exógeno nas células receptoras; a expressão de genes inseridos; e a estabilidade e replicação do DNA exógeno, resultando na expressão da característica fenotípica desejada (RUIZ-DÍEZ, 2002).

A parede celular presente nos fungos limita alguns processos de transformação genética por dificultar a passagem do DNA exógeno (CASE et al., 1979), assim a frequência de transformação de células de fungos filamentosos com paredes celulares intactas é geralmente

muito baixa, por isso obtêm-se células desprovidas de parede, os esferoplastos (protoplastos) (GROTELUESCHEN; METZEMBERG, 1995). Estas células são utilizadas no sistema de transformação denominado protoplasto-PEG, em que a absorção de DNA é intermediada pela presença de íons cálcio e polietileno glicol, e no sistema de eletroporação, no qual pulsos elétricos de curta duração permitem a entrada do vetor de transformação, sendo o método mais utilizado para transformar fungos filamentosos (RUIZ-DÍEZ, 2002).

Existem outras técnicas que possibilitam a inserção de um fragmento de DNA exógeno na célula hospedeira sem a necessidade de remover-se a parede. Uma delas é a transformação por acetato de lítio, onde as altas concentrações desta substância tornam a parede celular permeável ao DNA. E também o método de biobalística, em que ocorre o bombardeamento direto de hifas e conídios com partículas de tungstênio revestidas com DNA (RUIZ-DÍEZ, 2002).

Uma técnica que tem demonstrado vantagens em relação aos métodos de transformação convencionais é a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esse processo é baseado na capacidade da bactéria em transferir parte do seu DNA para células eucarióticas. O método utiliza células intactas e mostrou-se capaz de transferir DNA para fungos que pertencem a várias classes (MICHIELSE et al., 2005).

O primeiro relato de transformação genética em uma espécie fúngica é de 1973 em um mutante auxotrófico para inusitol de *Neurospora crassa* (MISHRA; TATUM, 1973). Porém, a baixa eficiência do processo aliada à dificuldade de reprodução e suspeitas de ocorrência de reversão espontânea, fizeram com que os resultados fossem recebidos com ceticismo (FINCHAM, 1989). Em seguida, outros relatos de transformação genética de fungos surgiram, como os trabalhos empregando protoplastos na transformação de *Neurospora crassa* (CASE et al., 1979) e *Aspergillus nidulans* (TILBURN et al., 1983).

Os métodos de transformação vêm sendo descritos para as mais variadas espécies fúngicas e o aumento das estratégias aplicadas têm possibilitado a realização de análises moleculares cada vez mais detalhadas. O desenvolvimento dos sistemas de transformação genética foi um grande avanço que possibilitou a manipulação do genoma dos organismos vivos e a correlação de estudos *in vitro* com as consequências *in vivo*. Sendo os fungos filamentosos uma fonte inesgotável de variedade e de potencial de inovação, a utilização da transformação genética para seu estudo e manipulação promete grandes avanços biotecnológicos (RUIZ-DÍEZ, 2002).

2.7. Transformação genética de fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A bactéria de solo *A. tumefaciens* é um bacilo aeróbico Gram-negativo (HOLT et al., 1994) responsável pela doença neoplásica de plantas denominada galha-da-coroa (DE LA RIVA et al., 1998). Esta bactéria possui a capacidade de transferir um segmento de DNA particular (T-DNA) do plasmídeo indutor de tumores (Ti) para o núcleo das células infectadas, onde é então integrado de forma estável no genoma do hospedeiro e transcrito, desencadeando a doença (BINNS; THOMASHAW, 1988).

No plasmídeo Ti estão presentes os genes *vir* que são responsáveis pela produção de proteínas que atuam no processo de transferência do T-DNA para a célula hospedeira. Os oncogenes responsáveis pelo desenvolvimento da doença estão localizados na região do T-DNA, flanqueada por duas sequências curtas denominadas borda direita e borda esquerda, que também atuam no processo de transferência do mesmo (TZFIRA; CITOVSKY, 2006). O processo de transferência do T-DNA pode ser induzido por compostos como a acetoseringona que ativam a expressão dos genes *vir* (KADO, 1991).

A habilidade de transferência gênica de *A. tumefaciens* tornou a transformação genética mediada por ela a tecnologia dominante para a produção de plantas geneticamente modificadas (TZFIRA; CITOVSKY, 2006). A metodologia foi inicialmente utilizada em fungos na transformação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BUNDOCK et al., 1995) e posteriormente adaptada para fungos filamentosos (DE GROOT et al., 1998). A difusão desta tecnologia possibilitou transformar com êxito fungos dos filos Ascomycota, Basidiomycota, Zigomycota e Oomycota (MICHIELSE et al., 2005).

Para a transformação genética *in vitro* mediada por *A. tumefaciens* utiliza-se uma variante do plasmídeo Ti denominado “plasmídeo desarmado ou *helper*”. Ele não apresenta a região do T-DNA nem suas bordas, assim a bactéria perde a capacidade de transferir material genético para a célula hospedeira. Os oncogenes presentes na região do T-DNA são substituídos por genes de interesse e inseridos em um vetor binário que é reintroduzido numa linhagem de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo desarmado, a qual readquire a capacidade de transformar células hospedeiras (LACORTE; ROMANO, 1998).

Esse método de transformação genética pode ser utilizado para a mutagênese insercional aleatória ou para a mutagênese direcionada, onde a integração ocorre por recombinação homóloga, se o T-DNA possuir sequências homólogas ao genoma do hospedeiro (MICHIELSE et al., 2005).

As vantagens da utilização da transformação mediada por *A. tumefaciens* em fungos estão na facilidade de execução, maior eficiência de transformação, inserção única do material genético no genoma do hospedeiro e por dispensar a necessidade de utilização de protoplastos como material inicial (FITZGERALD et al., 2003), já que podem também ser utilizadas células intactas como esporos, micélio e até tecidos do corpo de frutificação, com a mesma eficiência (MICHELSE et al., 2005).

A transformação de fungos por *A. tumefaciens* tem sido utilizada com diversos objetivos, como a investigação da interação fungo-planta, onde o estudo da colonização do tecido hospedeiro é possível por meio da transferência dos genes repórteres, promovendo uma alteração na coloração de estruturas fúngicas e permitindo o monitoramento de sua expressão (MULLINS; KANG, 2001).

2.8. O Gênero *Diaporthe*

O gênero de ascomiceto *Diaporthe* (fase anamórfica *Phomopsis*) pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Diaporthales e família Diaporthaceae (MYCOBANK, 2016). A eliminação do artigo 59 do Código Internacional de Nomenclatura para as Algas, Fungos e Plantas, excluiu a necessidade de utilizar-se a nomenclatura binomial para fungos pleomórficos. Assim, como o nome *Diaporthe* (1870) antecede a *Phomopsis* (1905) ele vem sendo utilizados nos estudos mais recentes (UDAYANGA et al., 2012; GOMES et al., 2013; UDAYANGA et al., 2014).

A identificação tradicional das espécies de *Diaporthe* é um desafio por basear-se na associação com o hospedeiro (UDAYANGA et al., 2014). Isto tem contribuído para a proliferação de nomes dentro desse gênero. Atualmente são listados no MYCOBANK (2016) 881 espécies de *Diaporthe* e 951 espécies de *Phomopsis*. Por isso, descrições sistemáticas modernas utilizam dados de sequências de DNA, que são meios mais precisos de identificação (CASTLEBURY et al., 2003). Os marcadores moleculares utilizados incluem a região espaçadora interna transcrita do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2), sequências parciais de actina (ACT), beta-tubulina (TUB), calmodulina (CAL), histona H3 (HIS), sequências do tipo de acasalamento (*MAT-mating-type*) (MAT 1-1-1 e MAT 1-2-1) e fator de alongação da tradução 1-alfa (TEF1) (DIOGO et al., 2010; SANTOS et al., 2010; UDAYANGA et al., 2012; GOMES et al., 2013).

O gênero *Diaporthe* compreende um grupo economicamente importante de fungos fitopatogênicos que causam doenças em uma ampla gama de culturas, plantas ornamentais e

árvores (CROUS, 2005; UDAYANGA et al., 2011). O fungo pode afetar várias partes da planta causando apodrecimento de frutos e raízes, cancos, manchas foliares, murcha entre outros (UECKER, 1988; MOSTERT et al., 2001; THOMPSON et al., 2011).

Várias espécies de *Diaporthe* podem ser encontradas em um único hospedeiro, bem como uma única espécie pode ser associada a muitos hospedeiros diferentes (CROUS, 2005; GOMES et al., 2013). A videira pode ser infectada por diversas espécies de *Diaporthe* que podem causar sintomas variáveis em diferentes partes da planta, como caule, folhas e frutos (MOSTERT et al., 2001). O fungo *Phomopsis viticola* é um fitopatógeno importante em todo o mundo por causar uma doença em videiras caracterizada pela presença de manchas nos ramos e folhas (HEWITT; PEARSON, 1988). O grau de comprometimento da planta com danos aos brotos, atrofia, perda de vigor, redução dos cachos e podridão pode causar sérios prejuízos (PEARSON; GOHEEN, 1994).

Espécies do gênero *Diaporthe* (= *Phomopsis*) também podem ser encontradas como saprófitos e endófitos (UDAYANGA et al., 2011). Como endófitos são relatados como um dos gêneros mais frequentes em diversas espécies de plantas (MURALI et al., 2006, BOTELLA; DIEZ, 2011). Uma das espécies endofíticas desse gênero é a *Diaporthe schini*, que foi descrita recentemente e recebeu esta denominação por ter sido isolada de *Schinus terebinthifolius*, planta conhecida popularmente como aroeira (GOMES et al., 2013).

O fungo *Phomopsis viticola* também foi isolado como endofítico de videiras da espécie *Vitis vinifera*, presente principalmente na região dos nós e entrenós, partes da planta onde geralmente provoca a doença (MOSTERT et al., 2000). Outros trabalhos também demonstraram que espécies de *Diaporthe* são comumente encontradas como endofíticas em videiras (GONZÁLES; TELLO, 2011; BRUM et al., 2012, FELBER et al., 2016).

Fungos pertencentes a esses gêneros têm sido relatados na literatura por seu amplo potencial biotecnológico. Entre outras aplicações, são produtores de metabólitos secundários (ISAKA et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2003), causadores de redução na herbivoria (VESTERLUND et al., 2011), podem ser aplicados como bioherbicidas (ASH et al., 2010) e apresentam potencial para o controle de fitopatógenos (FELBER et al., 2016).

As transformações genéticas de fungos desse gênero foram uma iniciativa para estudar a patogênese de *Phomopsis viticola*. Guido et al. (2003) utilizaram a transformação genética pelo sistema protoplasto-PEG para a inserção do gene *hph*, que confere resistência a higromicina e do gene *Bmlr*, que confere resistência ao benomil. Anco et al. (2009) utilizaram a mesma técnica para inserir o gene *gfp* em *Phomopsis viticola* e observar sua penetração e

invasão do hospedeiro por microscopia de fluorescência. Eles obtiveram transformantes estáveis e sem qualquer alteração na virulência em relação ao fungo selvagem.

Recentemente são relatados na literatura estudos de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* realizados em diferentes espécies do gênero *Diaporthe*. Com objetivo de estudar a genômica funcional do patógeno *Phomopsis longicolla*, causador da podridão das sementes em soja, Li et al. (2013) desenvolveram um sistema de transformação em que foram obtidos transformantes estáveis e expressando o gene *gfp* constitutivamente tanto nas hifas quanto nos conídios.

Sebastianes et al. (2012) estabeleceram um sistema de transformação para *Diaporthe phaseolorum* mediado por *A. tumefaciens* para estudar os genes de vias relacionadas com a biossíntese de antibióticos produzidos pelo metabolismo secundário deste fungo. Todos os transformantes mostraram-se estáveis e expressando os genes de seleção para a resistência à higromicina B (*hph*) e para a produção da proteína GFP (*gfp*).

Os fungos endofíticos *Diaporthe terebinthifolii* e *D. endophytica* receberam o gene repórter *DsRed-Express* na transformação realizada por Santos et al. (2016), em que foram obtidos transformantes estáveis e morfologicamente semelhantes à linhagem selvagem. Quando inoculados em folhas de citros, os transformantes apresentaram colonização intercelular e testes de antagonismo *in vitro* demonstraram que a inserção de DNA exógeno não alterou a capacidade desses fungos em inibir o patógeno *Phyllosticta citricarpa*.

Considerando a abundância de fungos pertencentes a esse gênero, sua variedade de hospedeiros e a sua importância econômica e ecológica, os estudos envolvendo a transformação genética de *Diaporthe* e suas potenciais aplicações são pouco relatados na literatura.

3. Referências

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5ed. London: Elsevier Academic Press, 2005.
- ALLEWELDT, G.; SPIEGEL-ROY, P.; REISCH, B. Grapes (*Vitis*). **Acta Horticulturae**, n. 290, p. 291-337, 1990.
- ANCO, D. J.; KIM, S.; MITCHELL, T. K.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A.; Transformation of *Phomopsis viticola* with the green fluorescent protein. **Mycologia**, n. 101, p. 8538-8558, 2009.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 161 p. 105-121, 2009.
- ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KUKLIMSKY SOBRAL, J.; PIZZIRANI- KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2010.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, p. 541-549, 2007.
- ARNOLD, A. E.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.
- ASH, G. J.; STODART, B.; SAKUANRUNGSIRIKUL,S.; ANSCHAW,E.; CRUMP, N.; HAILSTONES, D.; HARPER, J. D. Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. **Mycologia**, v. 102, p. 54–61, 2010.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed). **Fungi: multifaceted microbes**. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.
- BACON, C. W.; WHITE JR., J. F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- BACON, C. W.; HILL, N. S. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of infected grasses. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Org). **Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants**. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1996.

- BINNS, A.N.; THOMASHOW, M.F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, p. 575-606, 1988.
- BOTELLA, L.; DIEZ, J. J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 9-18, 2011.
- 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**, v. 11, p. 4187-4197, 2012.
- BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. J. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 14, p. 3206-3214, 1995.
- BURRUANO, S.; ALFONZO, A.; LO PICCOLO, S.; CONIGLIARO, G.; MONDELLO, V.; TORTA, L.; MORETTI, M.; ASSANTE, G. Interaction between *Acremonium byssoides* and *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 47, p. 122-131, 2008.
- BUTT, M. T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Introduction – Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: BUTT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Org.). **Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 1-8.
- CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva**. Ritschel, P.; Sebben, S. S. (Eds.) Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010.
- CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. **Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em Regiões Tropicais do Brasil: Cultivares**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. (Sistemas de produção, 9). Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasRusticasParaProcessamento/cultivares.htm>>. Acesso em: 12 out. 2013.
- CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E.; Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3034-3043, 1978.
- CASE, M. E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S. R. GILES, N. H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 5259-5263, 1979.
- CASIERI, L.; HOFSTETTER, V.; VIRET, O.; GINDRO, K. Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, p. 73-83, 2009.
- CASTLEBURY, L. A.; FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; JAKLITSCH, W. J. *Diaporthe angelicae* comb. nov., a modern description and placement of *Diaporthopsis* in *Diaporthe*. **Mycoscience**, v. 44, p. 203-208, 2003.
- COOK, R. J. Advances in plant health management in the twentieth century. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 95-116, 2000.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Minnesota: The American Phytopathological, 1983.

CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C. O cultivo de uvas de mesa no Brasil e no mundo e sua importância econômica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE UVAS DE MESA, 1., 2000, Ilha Solteira. **Anais...Ilha Solteira**: UNESP Feis, 2001. p.1-19.

CROUS, P. W. Impact of molecular phylogenetics on the taxonomy and diagnostics of fungi. **EPP0 Bulletin**, v. 35, p. 47-51, 2005.

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

DE LA RIVA, G. A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.; AYRAPARDO, C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1 n. 3, 1998.

DIAS, M. S. C.; SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, A. F. Principais doenças da videira. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 194, p. 76-84, 1998.

DIOGO, E. L. F.; SANTOS, J. M.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 107-115, 2010.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ed. Caxias do Sul: Edusc - Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010.

FAN, C.; PU, N.; WANG, X.; WANG, Y.; FANG, L.; XU, W.; ZHANG, J. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 197-206, 2008.

FAOSTAT – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

FELBER, A. C.; ORLANDELLI, R. C.; RHODEN, A. S.; GARCIA, A.; COSTA, A. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 765-775, 2016.

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

FITZGERALD, A. M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, v. 107, n. 7, p. 803-810, 2003.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; GOMES, V. N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, n. 29, p. 322-324, 2004.

- GIOVANNINI, E. **Manual de Viticultura: Série Tekne**. Bookman Editora, 2014.
- GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, p. 1-41, 2013.
- GONZÁLES, V.; TELLO, M. L. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 29–42, 2011.
- GROTELUESCHEN, J.; METZEMBERG, R. L. Some property of the nucleus determines the competence of *Neurospora crassa* for transformation. **Genetics**, v. 139, n. 4, p. 1545-1551, 1995.
- GUIDO, M. A. D.; POLLASTRO, S.; CARLUCCI, A.; ANGELINI, R. M. D. M.; FARETRA, F. *Phomopsis viticola* is easily transformed with hph and Bmlr genes. **Journal of Plant Pathology**, v. 85, p. 43-52, 2003.
- HAJEK, A. E. **Natural Enemies: An Introduction to Biological Control**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 895-914, 1997.
- HEWITT, W. B.; PEARSON, R. C. **Compendium of Grape Diseases**. In: PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. (Ed.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1988.
- HIDALGO, L. **Tratado de Viticultura General**. 3ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2002.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore. Willians & Wilkins. 1994.
- ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1015-1018, 2001.
- KADO, C. I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. **Critical Review in Plant Science**, v. 10, p. 1-32, 1991.
- KOBAYASHI, H.; MEGURO, S.; YOSHIMOTO, T.; NAMIKOSHI, M. Absolute structure, biosynthesis, and anti-microtubule activity of phomopsidin, isolated from a marine derived fungus *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**, v. 59, p. 455-459, 2003.
- KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-363, 2006.
- LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Eds.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998. p. 93-109.

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

LEÃO, P. C. S. **Cultivo da videira: cultivares**. EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2010. (Sistemas de produção, 1 – 2a. edição). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/cultivares.html>. Acesso em: 22 out. 2015.

LEÃO, P. C. S. **Cultivo da videira: cultivares**. EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2004. (Sistemas de produção, 1). Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/cultivares.htm>>. Acesso em: 12 set. 2015.

LEÃO, P. C. S. Principais variedades. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J.M. (Eds.). **A viticultura no Semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000.

LI, S.; RIDENOUR, J. B.; KIM, H.; HIRSCH, R. L.; RUPE, J. C.; BLUHM, B. H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the soybean pathogen *Phomopsis longicolla*. **Journal of Microbiological Methods**, n. 92, p. 244-245, 2013.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p. 15-28.

LORANG, J. M.; TUORI, R. P.; MARTINEZ, J. P.; SAWYER, T. L.; REDMAN, R. S.; ROULLINS, J. A.; WOLPERT, T. J.; JOHNSON, K. B.; RODRIGUEZ, R. J.; DICKMAN, M. B.; CIUFFETTI, L. M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1987-1994, 2001.

LUCERO, M. E.; BARROW, J. R.; OSUNA, P.; REYES, I. Plant-fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale processes. **Journal of Arid Environments**, n. 65, p. 276-284, 2006.

MAOR R.; PUYESKY M.; HORWITZ B. A.; SHARON A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research**, v. 102, n. 4, p. 491-496, 1998.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.

MATZ, M. V.; FRADKOV, A. F.; LABAS, Y. A.; SAVITSKY, A. P.; ZARAIISKY, A. G.; Markelov, M. L.; Lukyanov, L. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 969-973, 1999.

MCGOVERN, P. E. **Ancient Wine: the search for the origin of viniculture**. Princeton: Princeton University Press, 2003.

MEJÍA, L. C.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; A. ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4-14, 2008.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012**. 1ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 5p. (Comunicado Técnico, 137). Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2015.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: Panorama 2010**. 1ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. 4p. (Comunicado Técnico, 111).

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Eds.) **Micologia: avanços no conhecimento**. Brazilian Society Microbiology Publ., Recife, 2007. p. 129-140.

MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; RAM, A. F. J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics. **Current Genetics**, v. 48, p.1-17, 2005.

MIELE, A.; DALL'AGNOL, I.; RIZZOM, L. A. Efeito de reguladores de crescimento no tamanho da baga e na composição do mosto da uva-Ítália. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 2, p. 272-276, 2000.

MIKKELSEN, L.; SARROCCO, S.; LÜBECK, M.; JENSEN, D. F. Expression of the red fluorescent protein *DsRed-Express* in filamentous ascomycete fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 1, p. 135-139, 2003.

MISHRA, N. C.; TATUM, E. L. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3875-3879, 1973.

MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; KANG, J. C.; PHILLIPS, A. J. L. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. **Mycologia**, v. 93, p. 146-167, 2001.

MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. **Sydowia**, v. 52, p. 46-48, 2000.

MULLINS, E. D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n.14, p. 2043-2052, 2001.

MURALI, T. S.; SURYANARAYANAN, T. S.; GEETA, R. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 673-680, 2006.

MUSETTI, R.; VECCHIONE, A.; STRINGHER, L.; BORSELLI, S.; ZULINI, L.; MARZANI, C.; D'AMBROSIO, M.; SANITÀ DI TOPPI, L.; PERTOT, I. Inhibition of

sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v. 96, p. 689-698, 2006.

MYCOBANK –**Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks**. Disponível em: <<http://www.mycobank.org>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, article ID 250693, 2014.

OKI, Y.; FERNANDES, G. W.; CORREA JUNIOR, A. Fungos: amigos ou inimigos? **Ciência Hoje**, v. 42, n. 252, p. 64-66, 2008.

PAMPHILE, J. A.; ROCHA, C. L. M. S. C.; AZEVEDO, J.L. Co-transformation of a tropical maize endophytic isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*) with *gusA* and *nia* genes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 253-258, 2004.

PANCHER, M.; CEOL, M.; CORNEO, P. E.; LONGA, C. M. O.; YOUSAF, S.; PERTOT, I.; CAMPISANO, A. Fungal endophytic communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4308-4317, 2012.

PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. **Compendium of Grape Diseases**. In: HEWITT, W. B.; PEARSON, R. C. (Eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1994.

PEDROZO, R. **Transformação de *Fusarium oxysporum* f. os. *vasinfectum* com os genes marcadores GFP e DsRed**. Lavras: UFLA, 2009. 44 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras 2009.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

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

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J. **Uva: da antiguidade a mesa de nossos dias**. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. (Ed.). Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 2008. p. 891-909.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314- 330, 2009.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. Fungal life-styles and ecosystem dynamics: Biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. **Advances in Botanical Research**, v. 24, p.169-193, 1997.

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 189-195, 2002.

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

SANTOS, P. J. C.; SAVI, D. C.; GOMES, R. R.; GOULIN, E. H.; SENKIV, C. C.; TANAKA, F. A. O.; ALMEIDA, A. M. R.; GALLI-TERASAWA, L.; KAVA, V.; GLIENKE, C. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research**, n. 186-187, p. 153-160, 2016.

SANTOS, J. M.; CORREIA, V. G.; PHILLIPS, A. J. L. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. **Fungal Biology**, v. 114, p. 255-270, 2010.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K.; KROHN, K. Endophyte fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SEBASTIANES, F. L. S.; LACAVAL, P. T.; FÁVARO, L. C. L.; RODRIGUES, M. B. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, an endophytic fungus found in mangrove forests, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, v. 58, n. 1, p. 21-33, 2012.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 59, n. 3, p. 223-239, 1962.

SOEJIMA, A.; WEN, J. Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on three chloroplast markers. **American Journal of Botany**, v. 93 n. 2, p. 278-287, 2006.

SÔNIGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 32p. (Circular Técnica, 56).

SOUSA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 1996.

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

SPRING, K. R. Fluorescence microscopy. In: **Encyclopedia of Optical Engineering**, Marcel Dekker Inc, New York, USA, 2003, p. 548-555.

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

STONE, J. K.; VIRET, O.; PETRINI, O.; CHAPELA, I. Histological studies of host penetration and colonization by endophytic fungi. In: PETRINI, O.; OUELLETTE, G. B. **Host Wall Alterations by Parasitic Fungi**. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1994.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, v. 142, p. 435-440, 1996.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

THOMPSON, S. M.; TAN, Y. P.; YOUNG, A. J.; NEATE, S. M.; AITKEN, E. A.; SHIVAS, R. G. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. **Persoonia**, v. 27, p. 80-89, 2011.

THORN, G. The fungi in soil. In: **Modern soil microbiology**. VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1997. p. 63-127.

TILBURN, J.; SCAZZOCCHIO, C.; TAYLOR, G. G.; ZABICKY-ZISSIMA, J. H.; LOCKINGTON, R. A.; DAVIS, R. W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, p. 205-221, 1983.

TJAMOS, E. C.; TJAMOS, S. E.; ANTONIOU, P. P. Biological management of plant diseases: Highlights on research and application. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 4, p. 17-21, 2010.

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

UDAYANGA, D.; CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y.; HYDE, K. D. Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytospora*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. **Persoonia**, v. 32, p. 83-101, 2014.

UDAYANGA, D.; LIU, X.; CROUS, P. W.; MCKENZIE, E. H. C.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). **Fungal Diversity**, v. 56, p. 157-171, 2012.

UDAYANGA, D.; LIU, X.; MCKENZIE, E. H. C.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H. A.; HYDE, K. D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 189-225, 2011.

UECKER FA. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. **Mycological Memoirs**, v. 13, p. 1-231, 1988.

VESTERLUND, S. R.; HELANDER, M.; FAETH, S. H.; HYVÖNEN, T.; SAIKKONEN, K. Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 109-118, 2011.

WANG, Y.; DAI, C. C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 207-215, 2011.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, p. 274-276, 1995.

Capítulo 2

Transformação genética de fungos endofíticos *Diaporthe schini* isolados de *Vitis labrusca* e atividade antagonística em patógenos

Artigo elaborado e formatado de acordo com as normas para publicação científica no periódico *Current Genetics*.

Transformação genética de fungos endofíticos *Diaporthe schini* isolados de *Vitis labrusca* e atividade antagonística em patógenos.

ARETUSA CRISTINA FELBER¹, ALESSANDRA TENÓRIO COSTA¹, JULIO CESAR POLONIO¹, ELIANE PAPA AMBROSIO-ALBUQUERQUE¹, JOÃO ALENCAR PAMPHILE¹, KÁTIA SOCORRO MATHIAS MOURÃO^{2*}, JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO¹

¹ Laboratório de Biotecnologia Microbiana. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. Universidade Estadual de Maringá.

² Laboratório de Anatomia Vegetal. Departamento de Biologia. Universidade Estadual de Maringá.

*Autor para correspondência: Av. Colombo, 5.790, Jd. Universitário, Bloco G-80, sala 210, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. Tel: (44) 3011-4726. E-mail: ksmmourao@gmail.com

Resumo Doenças fúngicas estão entre os maiores problemas no cultivo de uvas, uma das frutas mais consumidas no mundo. Para minimizar a aplicação de fungicidas e diminuir impactos ambientais pode-se utilizar micro-organismos no controle biológico de patógenos, como os endófitos. Fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* isolados de *Vitis labrusca* apresentaram antagonismo *in vitro* frente a fitopatógenos da videira. Este estudo teve por objetivos identificar em nível de espécie dois fungos endofíticos de videira pertencentes ao gênero *Diaporthe*, estabelecer uma metodologia de transformação genética destes fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, obtendo transformantes estáveis e rastreáveis no ambiente pela produção das proteínas fluorescentes verde e vermelha. Objetivou-se ainda comparar a atividade antagonística em fungos patogênicos da videira dos transformados em relação à linhagem selvagem. As análises moleculares confirmaram a identidade dos dois fungos como *Diaporthe schini* e foram obtidas altas frequências de transformação, 96 % com o plasmídeo pFAT-gfp para *D. schini* (B64-46) e 98 % com pCAMDsRed para *D. schini* (C27-07). Os transformantes mostraram-se resistentes à higromicina B, com a presença do gene *hph* confirmada pela técnica de PCR, se apresentaram mitoticamente estáveis e expressando o fenótipo fluorescente, com diferenças morfológicas nas colônias em relação às linhagens selvagens. Testes de antagonismo *in vitro* dos transformantes contra fungos fitopatogênicos da videira não evidenciaram variação na atividade antagonística em relação à linhagem selvagem. A transformação genética de *D. schini* mediada por *A. tumefaciens* demonstrou ser uma técnica eficiente na inserção aleatória de genes repórteres para o monitoramento da linhagem no ambiente.

Palavras-chave Transformação mediada por *Agrobacterium*. Fungos endofíticos. Proteínas fluorescentes. Videira. Controle biológico

Introdução

Os fungos patogênicos podem causar perdas enormes em plantas cultivadas, demandando constantemente o desenvolvimento de novas formas de limitar as doenças (Mullins e Kang 2001). O cultivo de videiras é amplo e economicamente importante no mundo, no ano de 2013 a área cultivada foi de aproximadamente 7 milhões de hectares e a produção

de uvas ultrapassou 77 milhões de toneladas (Faostat 2015). Porém, a maioria das cultivares de videira é altamente suscetível à vários micro-organismos patogênicos, como fungos, oomycetos, bactérias, fitoplasmas e vírus (Gomès e Coutos-Thévenot 2009).

Os micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam de forma assintomática o interior de tecidos vegetais durante todo ou parte do seu ciclo de vida (Petrini 1991), sendo que a interação endófito-hospedeiro consiste em um equilíbrio de antagonismos entre ambos (Schulz e Boyle 2005). Eles podem conferir diversas vantagens ao hospedeiro como aumento da taxa de crescimento, redução da herbivoria, proteção contra pragas e indução de resistência sistêmica contra patógenos (Wagner e Lewis 2000). Isto se deve à sua habilidade na produção de substâncias que inibem o crescimento de outras espécies de micro-organismos, uma característica que confere aos endófitos potencial promissor no controle biológico (Arnold 2008).

Estudos utilizando endófitos no biocontrole de patógenos da viticultura têm sido realizados (Musseti et al. 2006; Burruano et al. 2008; Brum et al. 2012; Felber et al. 2016), mas investigações relacionadas às interações entre endófitos e a videira *in vivo* são escassos. Esse tipo de investigação exige uma precisa identificação do inóculo para as análises microscópicas e uma das principais estratégias para a observação de linhagens marcadas *in situ* é a utilização de moléculas protéicas fluorescentes produzidas pelo próprio espécime, como a proteína verde fluorescente (GFP) e a proteína vermelha fluorescente (DsRed) (Larrainzar et al. 2005). Essas moléculas são altamente estáveis, demandam apenas luz ultravioleta e oxigênio para emissão da fluorescência (Lorang et al. 2001), além de não necessitarem de substrato exógeno nem afetarem o tecido examinado (Maor et al. 1998).

Para a inserção de genes que produzem proteínas fluorescentes em fungos pode ser utilizada a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Ela se baseia na capacidade da bactéria em transferir parte do seu DNA para células eucarióticas intactas como esporos, micélio e até tecidos do corpo de frutificação (Michielse et al. 2005). As vantagens dessa técnica estão na facilidade de execução, alta eficiência de transformação e inserção única do material genético no genoma do hospedeiro (Fitzgerald et al. 2003).

Fungos dos gêneros *Diaporthe* (= *Phomopsis*) são encontrados em uma variada gama de plantas como patógenos, sapróbios ou endófitos (Uecker 1988). Eles já foram relatados como produtores de metabólitos secundários (Isaka et al. 2001, Kobayashi et al. 2003) na redução da herbivoria (Vesterlund et al. 2011) e na aplicação como bioherbicidas (Ash et al. 2010). O fungo *Phomopsis viticola* causa a doença do tronco em videiras de todo o mundo, que se caracteriza pela presença de lesões necróticas escuras nos ramos e folhas (Hewitt e Pearson 1988). Esse

fungo pode causar sérios prejuízos devido ao comprometimento dos brotos, atrofia, perda de vigor, redução dos cachos e podridão (Pearson e Goheen 1994). Espécies de *Diaporthe/Phomopsis* também estão presentes como endófitos em diversos hospedeiros de regiões temperadas e tropicais, sendo comuns em videiras (Mostert et al. 2000; Gonzáles e Tello 2011; Brum et al. 2012; Felber et al. 2016).

A identificação de espécies desse gênero, que se baseava inicialmente em características morfológicas e na associação com o hospedeiro, tem sido substituída com sucesso por análises filogenéticas multigênicas. Esta metodologia foi utilizada na identificação da espécie *Diaporthe schini*, descrita recentemente, que recebeu esta denominação por ter sido isolada originalmente como endófitica de *Schinus terebinthifolius*, planta conhecida popularmente como aroeira (Gomes et al. 2013).

Considerando que os fungos do gênero *Diaporthe* isolados de folhas das videiras Bordô e Concord (*Vitis labrusca* L.) apresentaram potencial no antagonismo *in vitro* contra fungos fitopatogênicos da videira (Felber et al. 2016), o presente trabalho teve por objetivos identificar em nível de espécie dois fungos endofíticos de videira pertencentes ao gênero *Diaporthe*, estabelecer uma metodologia de transformação genética para estes fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, com a obtenção de transformantes estáveis e rastreáveis no ambiente pela expressão dos genes produtores das proteínas fluorescentes verde e vermelha (*gfp* e *DsRed-Express*), e avaliar a atividade antagonística dos transformados frente a fungos patogênicos da videira em relação à linhagem selvagem.

Materiais e métodos

Linhagens e plasmídeos

Foram utilizados dois fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* isolados das cultivares de videira Bordô e Concord (*Vitis labrusca* L.), que fazem parte do estoque do Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular (DBC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil. A identificação molecular inicial foi baseada no sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e as sequências estão depositadas no GenBank como *Diaporthe* sp. KM362383.1 (B64-46: código de estoque da linhagem) e *Diaporthe* sp. KM362392.1 (C27-07). A seleção dos endófitos

considerou resultados promissores na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos da videira em experimento preliminar de cultura pareada (Felber et al. 2016).

As linhagens desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo os plasmídeos pFAT-gfp e pCAMDsRed foram gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos Labate (Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil). O vetor binário de transformação de fungos pFAT-gfp (Fitzgerald et al. 2003) foi gentilmente cedido por Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália). Ele contém 18.422 pb e possui, na região do T-DNA, o gene de resistência à higromicina B de *Escherichia coli*, *hph*, dirigido pelo promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *gpd*, de *Glomerella cingulata*, e o gene da proteína verde fluorescente, *gfp*, da água-viva *Aequorea victoria*. Já o vetor binário de transformação de fungos pCAMDsRed (Eckert et al. 2005) foi adquirido do Fungal Genetics Stock Center e possui 12.008 pb contendo, na região T-DNA, o gene de resistência à higromicina B de *E. coli*, *hph*, dirigido pelo promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *PgpdA*, de *Aspergillus nidulans*, e o gene da proteína vermelha fluorescente, *DsRed-Express*, do coral *Discosoma* sp.

Identificação molecular multigênica

Para identificar as espécies das linhagens de *Diaporthe* sp. utilizamos uma metodologia de identificação molecular multigênica. Inicialmente as linhagens de *Diaporthe* sp. (B64-46 e C27-07) foram crescidas por 7 dias a 28 °C em placas de Petri contendo meio BD (Batata-dextrose) (Smith e Onions 1983) com pH 6,6 e posteriormente os micélios foram lavados com água destilada esterilizada. O DNA genômico foi extraído segundo a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985) e modificada por Pamphile e Azevedo (2002).

Foram utilizados os *primers* EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') e EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') (Carbone e Kohn 1999) para amplificar parte do gene do fator de alongação 1- α (TEF1); T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') (O'Donnel e Cigelnik 1997) e Bt-2b (5'-ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC-3') (Glass e Donaldson 1995) para amplificação parcial do gene da β -tubulina (TUB); e os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) (White et al. 1990).

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 μ L, constituídas de Tampão de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 1X, 25 μ M de dNTPs, 0,6 μ M de cada *primer* (*foward* e *reverse*), 0,04 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), e 10 ng de DNA

genômico. A concentração de $MgCl_2$ para as reações foram: 3,75 mM para o gene ITS; 2 mM para TEF1; e 1,5 mM para TUB. As condições de PCR para TEF1 e TUB foram: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 40 ciclos com: desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento a 55 °C por 1 min; extensão a 72 °C por 1 min; com extensão final a 72 °C por 3 min. Para o gene ITS, foi utilizada desnaturação inicial a 92 °C por 4 min; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 40 s, anelamento a 52 °C por 1 min e 30 s, e extensão a 72 °C por 2 min; seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5 %, utilizando como padrão de peso molecular DNA *ladder* 1 kb (Kasvi) e aplicando 70 Volts por 90 min. Posteriormente foi realizado o sequenciamento utilizando o equipamento ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os resultados dos sequenciamentos foram avaliados utilizando o *software* BioEdit v. 7.2.2.

As sequências foram comparadas com outras depositadas no GenBank, restringindo a busca às sequências tipo (*type strains*). Para os fungos identificados como pertencentes ao gênero *Diaporthe*, foram selecionadas outras espécies com maior similaridade baseado em dados filogenéticos disponíveis no banco TreeBASE (Estudo S13943; www.treebase.org). As sequências foram então resgatadas e alinhadas usando a interface *online* MAFFT (Kato e Toh 2008; <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Após o alinhamento, foi realizada a montagem multigênica das sequências utilizando o *software* SequenceMatrix (Vaidya et al. 2011; <http://gaurav.github.io/taxondna/>).

Na análise filogenética baseada na Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana foi utilizado o *software* MrModelTest v. 2.3 (Nylander 2004) para a escolha do melhor modelo evolucionário. O *software* MrBayes v. 3.2.5 (Ronquist et al. 2012) foi empregado para gerar a árvore filogenética, considerando os parâmetros gerados pelo MrModelTest, com MCMC (Markov Chain Monte Carlo) até o desvio padrão médio das frequências chegar abaixo de 0.01. A árvore foi editada utilizando o *software* FigTree v. 1.4.2 (Rambaut 2009).

Teste de sensibilidade à higromicina B

A presença do gene de resistência à higromicina nos plasmídeos utilizados neste estudo demandou que fosse inicialmente detectada a concentração inibitória mínima (CIM) de higromicina B capaz de impedir o crescimento dos fungos selvagens. Essa concentração deve ser adotada posteriormente para a seleção dos fungos transformantes.

As duas linhagens já identificadas como *Diaporthe schini* foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-dextrose-ágar) (Smith e Onions 1983) acrescido de quantidades crescentes de higromicina B (Invitrogen) (0, 5, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL). Foram utilizadas três repetições e as placas de Petri foram incubadas por 7 dias a 28 °C no escuro.

Transformação dos fungos

Os fungos *D. schini* foram transformados por *A. tumefaciens* utilizando a metodologia de De Groot et al. (1998), com modificações. As linhagens de *A. tumefaciens* abrigoando o vetor pFAT-gfp (Fitzgerald et al. 2003) e pCAMDsRed (Eckert et al. 2005) foram incubadas a 28 °C, por 24 h em 10 mL de meio YEP (10 g de extrato de levedura; 10 g de peptona; 5 g de NaCl; 15 g de ágar; 1000 mL de água destilada; pH 7,0). Para a linhagem contendo o vetor pFAT-gfp o meio foi suplementado com 300 µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 100 µg/mL de rifampicina (Sigma), enquanto para a linhagem contendo o vetor pCAMDsRed foram adicionados 100 µg/mL de canamicina (Sigma) e 100 µg/mL de rifampicina (Sigma). As culturas foram mantidas sob agitação (200 rpm). Posteriormente as células de *A. tumefaciens* foram centrifugadas a 4000 rpm por 7 min e diluídas até atingirem uma densidade ótica (OD_{600 nm}) de 0,2 com meio indutor líquido (IM) (10 mM de K₂HPO₄; 10 mM de KH₂PO₄; 2,5mM de NaCl; 2mM de MgSO₄; 0,7 mM de CaCl₂; 9 µM de FeSO₄; 4 mM de NH₄SO₄; 10 mM de glicose; 0,5 % glicerol; e após autoclavagem foi adicionado 40 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (Sigma) esterelizado com membrana de polietersulfona de 0,22 µm (Techno Plastic Products), pH 5,3 e 200 µM de acetoseringona (Sigma). As culturas foram incubadas por 6 h a 28 °C, até atingirem OD_{600nm} de 0,6.

Os micélios das linhagens de *D. schini* (B64-46 e C27-07) foram crescidos previamente em meio BDA a 28 °C por 7 dias e preparadas soluções em meio BD, incubadas a 28 °C por 6 horas. Essas soluções foram centrifugadas a 4000 rpm por 7 min e diluídas em meio indutor até atingirem OD_{600nm} de 0,6. Em seguida a suspensão de *A. tumefaciens* contendo o vetor pFAT-gfp foi misturada à suspensão de *D. schini* (B64-46) e o mesmo ocorreu com *A. tumefaciens* pCAMDsRed e *D. schini* (C27-07), sendo 20 µL da suspensão de cada micro-organismo, depositados um sobre o outro, em fragmentos de papel filtro qualitativo de 1,5 cm² (J. Prolab) previamente esterilizados. Foram utilizados 50 fragmentos para cada evento de transformação, contidos em placas de Petri com meio indutor, que foram incubadas a 28 °C por 48 h. Os fragmentos de papel filtro foram então transferidos para placas contendo meio

BDA com 25 µg/mL de higromicina para a seleção dos transformantes e 300 µg/mL de cefoxitina sódica (Kefox-ABL) para a eliminação das células de *A. tumefaciens*, onde permaneceram por 72 h. Os transformantes foram repicados em placas contendo meio BDA com 25 µg/mL de higromicina B e 300 µg/mL de cefoxitina sódica por mais 72 h e posteriormente transferidos para placas contendo BDA com 25 µg/mL de higromicina B. Foram considerados transformantes os fungos que foram capazes de crescer nessa condição.

Detecção da produção das proteínas GFP e DsRed

A expressão dos genes heterólogos foi determinada 7 dias após o crescimento dos transformados em placas contendo BDA com 25 µg/mL de higromicina B. Dez transformantes para o gene *gfp* e dez para o gene *DsRed-Express* foram escolhidos aleatoriamente e fragmentos de seu micélio foram inseridos diretamente em lâminas contendo água destilada esterilizada. Em seguida foram observados em microscópio de fluorescência (Olympus Bx51) com aumento de 40 X, utilizando o filtro FITC (480 nm) para os transformantes contendo o plasmídeo pFAT-*gfp* e o filtro TRITC (545 nm) para os transformantes contendo o plasmídeo pCAMDsRed. As imagens foram capturadas por uma câmera acoplada ao microscópio, utilizando o *software* Spectral Imaging (Carl Zeiss). As linhagens selvagens foram utilizadas como controle negativo.

Análise molecular dos transformantes

A extração do DNA dos fungos selvagens e de vinte transformantes expressando o fenótipo fluorescente verde ou vermelho foi realizada para a análise molecular. Os fungos foram crescidos em placas de Petri contendo 20 mL de meio BD, sendo que para os transformantes o meio acrescido de 25 µg/mL de higromicina B. As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias e posteriormente os micélios foram lavados com água destilada esterilizada. O DNA genômico foi extraído segundo a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985) e modificada por Pamphile e Azevedo (2002).

A concentração e pureza do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1 %, com uso de DNA *ladder* 1 kb (Kasvi) como padrão de peso molecular. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

A amplificação por PCR de um fragmento do gene *hph* de cada plasmídeo foi realizada utilizando os *primers* *hph* 1 (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e *hph* 2 (5'-

CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG–3’). A reação foi preparada com 0,2 mM de dNTPs, 3,7 mM de MgCl₂, 1x Tampão, 0,05 U/μL de Taq polimerase, 0,2 μM de cada *primer*, 10 ng de DNA e água ultrapura. A amplificação foi programada com desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguida por 30 ciclos com: desnaturação a 94 °C por 1 min; anelamento a 60 °C por 1 min; extensão a 72 °C por 1 min; e extensão final a 72 °C por 7 min. Para confirmar a presença dos genes específicos dos plasmídeos nas linhagens transformadas os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1 %.

Estabilidade mitótica

Para verificar a estabilidade genética os vinte transformantes foram cultivados em placas contendo BDA sem higromicina B por cinco culturas sucessivas de 7 dias, a 28 ° C, no escuro e depois transferidos para o meio BDA contendo 25 μg/mL de higromicina B. Foram considerados estáveis os transformantes que continuaram capazes de crescer em meio seletivo (Fitzgerald et al., 2003). Esses transformantes foram submetidos novamente à análise microscópica para confirmar a permanência da expressão dos genes heterólogos.

Atividade antagonística in vitro dos transformantes em fungos patogênicos da videira

A técnica utilizada foi a cultura pareada modificada de Campanile et al. (2007). Os testes foram realizados com os fungos selvagens e vinte transformantes contra os fungos patogênicos da videira cedidos pela EMBRAPA Uva e Vinho de Bento Gonçalves - RS, sendo eles: *Alternaria* sp. (CNPUV 674), causador da requeima das folhas e *Glomerella* sp. (CNPUV 378), responsável pela podridão da uva madura.

Em lados opostos de placas de Petri (9 cm) contendo BDA foram inoculados, a 4 cm de distância, discos de 5 mm de culturas dos fungos transformantes e fungos fitopatogênicos. Placas de controle foram inoculadas somente com discos de fitopatógenos. Os testes foram realizados em triplicata e todas as placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. As taxas de antagonismo foram calculadas segundo Campanile et al. (2007) e as interações competitivas entre os transformantes e os fitopatógenos foram determinadas segundo a escala de Badalyan et al. (2002). Para cada teste os valores médios obtidos foram comparados utilizando o teste de Tukey a 5 % de probabilidade, empregando o *software* SISVAR 5.3 (Ferreira 2011).

Resultados

Identificação molecular multigênica

A comparação das sequências de DNA obtidas para os genes ITS, TUB e TEF1, juntamente com outras sequências depositadas no Genbank, incluindo as sequências do estudo filogenético do gênero *Diaporthe* disponível no banco de dados TreeBASE (S13943), demonstrou que as duas linhagens endofíticas apresentaram uma alta identidade genética à fungos pertencentes à espécie *Diaporthe schini* (Tabela 1). Em relação ao fungo *Diaporthe* sp. (B64-46) foi observado que para o gene ITS obteve-se maior percentual de identidade para *Diaporthe terebinthifoli*, enquanto para os outros genes notou-se um maior percentual para *Diaporthe schini*. A linhagem *Diaporthe* sp. (C27-07) apresentou para todos os genes alto percentual de identidade com linhagens pertencentes à espécie *D. schini*.

Na análise Bayesiana do alinhamento dos genes ITS, TEF1 e TUB, observa-se o alinhamento específico com 100 % de probabilidade Bayesiana entre os isolados *Diaporthe* sp. (B64-46 e C27-07) e outras duas linhagens da espécie *D. schini*, formando um clado específico para esta espécie (Fig. 1).

Teste de sensibilidade à higromicina B

Na determinação da concentração inibitória mínima de higromicina B verificou-se que a concentração de 5 µg/mL, a menor utilizada no teste, foi capaz de inibir parcialmente o crescimento dos fungos *Diaporthe schini* (B64-46 e C27-07). Nas concentrações de 25 µg/mL e superiores ambos os fungos não apresentaram crescimento (Fig. 2). Portanto, a concentração definida para a seleção dos transformantes foi de 25 µg/mL de higromicina B.

Transformação dos fungos

A transformação das linhagens de *Diaporthe schini* por *A. tumefaciens* resultou em 48 transformantes de *D. schini* (B64-46) contendo o plasmídeo pFAT-gfp, com frequência de transformação de 96 %, e 49 transformantes de *D. schini* (C27-07) com o plasmídeo pCAMDsRed, com frequência de transformação de 98 %. A observação macroscópica das colônias dos transformantes em placas de Petri com meio seletivo evidenciou diferenças relacionadas ao crescimento, cor e morfologia em relação às linhagens selvagens (Fig. 3).

Detecção da produção das proteínas GFP e DsRed

A análise microscópica das hifas dos transformantes de *D. schini* confirmou a expressão dos genes heterólogos. Os dez transformantes contendo o plasmídeo pFAT-gfp foram visualizados na cor verde e os dez transformantes contendo o plasmídeo pCAMDsRed puderam ser vistos na cor vermelha. As hifas das linhagens selvagens não apresentaram fluorescência. Todos os transformantes observados apresentaram emissão de fluorescência ao longo da extensão de suas hifas, porém com distribuição não uniforme. Puderam ser notados segmentos de hifas com a expressão reduzida ou sem expressão dos genes heterólogos (Fig. 4).

Análise molecular dos transformantes

A técnica de PCR confirmou a presença do gene de resistência à higromicina B (*hph*) nos transformantes pela amplificação de um fragmento do gene com aproximadamente 600 pb. Pôde-se observar que, tanto nos dez transformantes contendo o plasmídeo pFAT-gfp quanto nos dez contendo o plasmídeo pCAMDsRed, o gene *hph* estava integrado ao genoma do fungo. A análise demonstrou ausência do fragmento do gene nas linhagens selvagens (Fig. 5).

Estabilidade mitótica

Todos os transformantes avaliados foram capazes de crescer em meio contendo higromicina B após as cinco culturas sucessivas em meio não seletivo, demonstrando que a resistência ao antibiótico foi preservada e a manutenção do gene marcador com 100 % de estabilidade mitótica. As análises microscópicas dos transformantes mitoticamente estáveis confirmaram também a permanência da expressão da fluorescência verde e vermelha.

Atividade antagonística in vitro dos transformantes contra fungos patogênicos da videira

As interações competitivas observadas entre as linhagens selvagens e transformantes em relação aos fitopatógenos foram 100 % do tipo A = Bloqueio de crescimento com contato micelial, de acordo com a escala de Badalyan (Fig. 6).

Os índices de antagonismo (IA) obtidos com a linhagem selvagem *Diaporthe schini* (B64-46) e seus transformantes contendo o gene *gfp* frente ao fitopatógeno *Alternaria* sp. (CNPUV 674) variaram de 35,96 % a 41,02 % (Tabela 2). Já em relação à *Glomerella* sp.

(CNPUV 378) alguns valores obtidos foram superiores, ficando entre 39,45 % e 52,68 % (Fig. 6). Nos dois casos os transformantes apresentaram IA superiores à linhagem selvagem, porém os valores dentro dos intervalos referidos não diferem estatisticamente.

Para o fungo *D. schini* (C27-07) e seus transformantes contendo o gene *DsRed-Express* os índices de antagonismo ao fitopatógeno *Alternaria* sp. (CNPUV 674) variaram de 37,20 % a 40,87 % e o valor referente à linhagem selvagem foi de 37,64 % (Tabela 3) (Fig. 6). Nos testes com *Glomerella* sp. (CNPUV 378) os valores foram mais elevados e todos os transformantes apresentaram resultados superiores à linhagem selvagem, os índices de antagonismo ficaram entre 38,28 % e 45,88 %. Também nesses casos os valores dentro dos intervalos não diferem estatisticamente, demonstrando que não houve alteração nas atividades antagonísticas dos transformantes em relação à linhagem selvagem.

Discussão

As proteínas repórteres fluorescentes são ferramentas úteis em diversos estudos de monitoramento de micro-organismos. Neste trabalho relatamos a transformação genética de duas linhagens endofíticas de *Diaporthe schini* isoladas de videiras (*Vitis labrusca* L.) com os genes de fluorescência *gfp* e *DsRed-Express*. Esses fungos foram identificados em um estudo anterior em nível de gênero (Felber et al. 2016), necessitando da identificação de sua espécie, mostrada neste trabalho.

A análise multigênica considerando as sequências dos genes ITS, TUB e TEF1, foi eficiente para a identificação em nível de espécie dos fungos endofíticos *Diaporthe* B64-46 e *Diaporthe* C27-07, confirmando a identidade de ambos como *D. schini*. Analisando os dados filogenéticos obtidos e aqueles disponíveis na literatura (Gomes et al. 2013) foi possível verificar que existe uma relativa proximidade evolutiva entre *D. schini* e *D. terebinthifoli*. Porém, na análise conjunta dos três genes, observou-se o alinhamento específico com 100 % de probabilidade Bayesiana entre os isolados *Diaporthe* sp. (B64-46 e C27-07) e outras duas linhagens da espécie *D. schini*, resultando em um clado específico para esta espécie. Esses dados em conjunto colaboraram para a identificação, via análise multigênica, dos dois isolados como *D. schini*.

O gene ITS, utilizado anteriormente para a identificação desses fungos, é considerado uma ferramenta robusta na identificação molecular em nível de gênero, mas para alguns grupos taxonômicos de fungos faz-se necessária a inclusão de genes adicionais que são específicos para a identificação da espécie (Schoch et al. 2012; Rhoden et al. 2013). Como ocorre no gênero

Diaporthe, em que a variação intraespecífica observada nas sequências ITS pode causar confusão na identificação das espécies se utilizada sozinha (Santos et al. 2010). Por isso, trabalhos recentes têm ressaltado a necessidade de uma análise filogenética multigênica para a identificação precisa de espécies desse gênero (Udayanga et al. 2012; Gomes et al. 2013).

A transformação tornou-se um dos pilares da genética moderna de fungos, possibilitando eventos como a mutagênese aleatória, introdução de genes repórteres e modificação direcionada do genoma, que são instrumentos importantes para a caracterização funcional de genes e na análise da biologia fúngica (Frandsen 2011). Estudos de transformação genética em fungos do gênero *Diaporthe* (= *Phomopsis*) surgiram com o objetivo de investigar a patogênese de *Phomopsis viticola* e adotaram como técnica a transformação por meio de protoplastos (Guido et al. 2003; Anco et al. 2009). Para a transformação genética dos fungos da espécie *D. schini* optou-se por utilizar a técnica mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, pois tem sido descrita como uma ferramenta eficaz para mutagênese insercional em uma ampla variedade de fungos filamentosos, incluindo representantes do gênero *Diaporthe* (Sebastianes et al. 2012; Santos et al. 2016).

Como fungos desse gênero produzem poucos esporos em meio de cultura, a transformação mediada por *A. tumefaciens* mostrou-se vantajosa por possibilitar a utilização do micélio fúngico como material de partida. Considerando as condições adotadas em nossa metodologia, pode-se concluir que essa técnica de transformação foi eficiente para as linhagens endofíticas de *D. schini*. Nossos resultados demonstram altas frequências de transformação, sendo 96 % para *D. schini* (B64-46) com o plasmídeo pFAT-GFP e 98 % para *D. schini* (C27-07) com pCAMDsRed. Como os fungos transformados pertencem à mesma espécie, a pequena diferença nos valores das frequências de transformação pode estar associada às diferenças existentes entre os plasmídeos ou à diversidade intraespecífica das linhagens fúngicas.

Apesar dos resultados satisfatórios evidenciados neste trabalho, alguns autores relatam que a utilização de tecido micelial no processo de transformação apresenta eficácia inferior ao uso de esporos (Sebastianes et al. 2012; Rodrigues et al. 2013). Como a obtenção de um maior número de transformantes geralmente está associada a um aumento no número de células fúngicas empregadas, a utilização de esporos é citada como mais vantajosa (Rolland et al. 2003; Reis et al. 2004).

Além das condições experimentais, a eficiência da transformação mediada por *A. tumefaciens* pode variar também entre as espécies fúngicas (De Groot et al. 1998). Diferentemente deste trabalho, na transformação do fungo *Fusarium proliferatum* foram obtidos melhores resultados com GFP do que com DsRed e a eficiência para o plasmídeo pFAT-

GFP alcançou 98 %, valor superior ao obtido neste estudo, enquanto para pCAMDsRed observou-se 90 % de transformação (Bernardi-Wenzel et al. 2016), percentual inferior ao obtido com *D. schini*. Um maior número de transformantes GFP em relação à DsRed também foi relatado por Bitsadze et al. (2015), porém foram marcadas espécies fúngicas diferentes, *Microsphaeropsis ochracea* e *Coniothyrium minitans*.

Os dados encontrados na literatura demonstram que a concentração do antibiótico higromicina B utilizada nos protocolos de transformação para a seleção de fungos transformantes do gênero *Diaporthe/Phomopsis* pode variar de 10 a 100 µg/mL (Guido et al. 2003; Anco et al. 2009; Sebastianes et al. 2012; Li et al. 2013; Santos et al. 2016), indicando diferenças na tolerância entre as espécies e a necessidade de se definir a concentração mínima inibitória para cada caso.

No ensaio de resistência à higromicina B, realizado previamente à transformação, foi observado que para as linhagens selvagens de *D. schini* a concentração de 5 µg/mL foi capaz de inibir parcialmente o crescimento das colônias e que concentrações com valores superiores inibiram totalmente. Esse resultado demonstrou que *D. schini* é pouco tolerante ao antibiótico, permitindo que fosse adotada a concentração de 25 µg/mL de higromicina para a transformação genética desta espécie e assegurando que o gene *hph* é um marcador confiável para a seleção dos nossos transformantes.

Um resultado semelhante a esse foi obtido por Anco et al. (2009), que observou no ensaio preliminar para a transformação do fungo fitopatogênico *P. viticola* que a concentração de 5 µg/mL inibiu totalmente o crescimento fúngico, adotando para a seleção dos transformantes um meio contendo 10 µg/mL de higromicina B. A baixa tolerância a esse marcador de seleção também foi observada para o fungo fitopatogênico *Marssonina brunnea*, com a utilização da concentração de 10 µg/mL para a seleção dos seus transformantes (Jiang et al. 2014).

A introdução de genes marcadores visuais podem desencadear alterações nas características dos fungos (Frandsen 2011). Constatamos que a inserção dos genes *gfp* e *DsRed-Express* nas linhagens de *D. schini* resultou em diferenças morfológicas observadas entre as colônias das linhagens selvagens e dos transformados para ambos os genes. Essas variações podem estar associadas às alterações nas condições de cultivo ou ao local de inserção do T-DNA no genoma fúngico. Como os genes de fluorescência se integraram ao genoma das linhagens de *D. schini* por meio de recombinação alguns genes podem ter se rompido, já que o processo é aleatório (Zhang et al. 2003). E mesmo que ocorra a inserção de uma única cópia do T-DNA isto pode resultar na alteração do fenótipo do transformante (Karunakaran et al. 2008).

Semelhante ao que foi observado em nosso estudo, a transformação da linhagem patogênica *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, em um evento de marcação que produziu três transformantes GFP e três DsRed, resultou em um transformante DsRed apresentando colônia com morfologia anormal (Sarocco et al., 2007). Mas isso difere do que tem sido observado em diversos estudos envolvendo a inserção desses mesmos genes em outros fungos do gênero *Diaporthe* (Sebastianes et al. 2012), bem como em outras espécies fúngicas (Crespo-Sempere et al. 2011; Muniz et al. 2014; Niño-Sánchez et al. 2015; Pierron et al. 2015).

Em relação às modificações das características fúngicas após a transformação, o que mais se descreve em transformantes para a expressão das proteínas fluorescentes, que também foi observado no presente trabalho, é a alteração do crescimento dos transformantes que, geralmente, é mais lento em relação à linhagem selvagem (Sarocco et al. 2007; Armesto et al. 2012), porém um acréscimo no crescimento desses fungos também foi descrito (Paparou et al. 2009).

Existem relatos de que a proteína DsRed pode ser detectada também visualmente em alguns fungos quando cultivados em meios sólidos, onde a colônia exibe um fenótipo vermelho (Mikkelsen et al. 2003; Janus et al. 2007) ou pode secretar o corante no meio de cultura (Kück e Hoff 2010). As alterações relacionadas à coloração observadas em nosso estudo referem-se à diminuição da produção de substâncias que conferem as tonalidades marrom e cinza, características da espécie *D. schini* (Gomes et al. 2013). A coloração dos micélios fúngicos é determinada pela produção de pigmentos que podem não ser necessários à sobrevivência do organismo, mas aumentam sua capacidade de sobreviver sob certas condições (Andolfi et al. 2011). Um exemplo é a melanina, que tem um papel importante na proteção de fungos fitopatogênicos contra os radicais livres de oxigênio produzidos no processo de defesa da planta contra a infecção pelo fungo (Henson et al. 1999). Assim, a interrupção dos genes responsáveis pela produção de pigmentos pode causar alterações no comportamento dos fungos.

A transformação genética com marcadores de fluorescência requer, além da inserção do T-DNA no organismo hospedeiro, que os genes de interesse permaneçam integrados ao genoma resultando no fenótipo desejado. Quando nossos transformantes foram testados quanto à estabilidade mitótica, observou-se que 100 % deles foram capazes de crescer na presença de higromicina B após as cinco gerações em meio não seletivo. Isso indica a manutenção da integração do DNA exógeno contendo o gene *hph* em seu genoma, confirmada pela técnica de PCR, bem como a expressão desse gene.

Resultados apresentando o total dos transformantes testados mitoticamente estáveis também foram obtidos na inserção de genes *gfp* e *DsRed-Express* via *A. tumefaciens* em outros

fungos do gênero *Diaporthe*, como *D. phaseolorum* (Sebastianes et al. 2012), *D. endophytica* e *D. terebinthifolii* (Santos et al. 2016). O mesmo ocorreu em transformantes fluorescentes das espécies *Marssonina brunnea* (Jiang et al. 2014) e *Ustilagoidea virens* (Andargie et al. 2015).

Outros estudos apresentaram resultados diferentes em relação à estabilidade genética dos transformantes. Utilizando as mesmas linhagens de *A. tumefaciens*, portando os mesmos plasmídeos empregados neste trabalho, Bernardi-Wenzel et al. (2016) obtiveram um percentual de transformantes estáveis mitoticamente inferior ao observado com *D. schini*, correspondendo a 95 % dos transformantes de *Fusarium proliferatum* para ambos os genes. Já a inserção do gene *gfp* em *Guignardia citricarpa* resultou em um valor ainda menor, 82 % de estabilidade mitótica (Rodrigues et al. 2013).

Todos os transformantes observados neste estudo tiveram a fluorescência verde ou vermelha confirmada. As pesquisas utilizando as proteínas fluorescentes GFP e DsRed na marcação de fungos têm referido que ambas apresentam a mesma eficiência, podendo ser empregadas para a dupla marcação de uma mesma linhagem (Mikkelsen et al. 2003; Eckert et al. 2005). Isso foi constatado nos transformantes de *D. schini*, já que as duas proteínas demonstraram emissão de fluorescência estável, observada na confirmação da expressão do fenótipo fluorescente pelos transformantes de *D. schini* e também depois da avaliação da estabilidade mitótica. A manutenção da fluorescência indica que a síntese e tradução de moléculas de mRNA permanece constante mesmo depois da remoção da pressão seletiva.

A eficácia equivalente das proteínas GFP e DsRed foi observada em dois eventos de dupla marcação de *Fusarium oxysporum* em que as hifas emitiram fluorescência verde e vermelha brilhante, porém, após a inoculação em plantas, os transformantes GFP foram visualizados mais facilmente (Sarocco et al. 2007; Paparu et al. 2009). Essa estratégia pode ser utilizada no estudo de linhagens com potencial no controle biológico, em que rotular uma linhagem com GFP e a outra com DsRed possibilita estudar o comportamento de ambas em um mesmo local (Mikkelsen et al. 2003).

As hifas dos transformantes de *D. schini* que apresentaram segmentos com redução ou completa ausência de expressão dos genes nas análises microscópicas podem ser provenientes de uma região mais velha do micélio, como relatado por Eckert et al. (2005). Eles observaram que, nos transformantes para a expressão de GFP e DsRed de *Leptosphaeria maculans*, os segmentos de hifas sem emissão de fluorescência apresentavam células colapsadas. Esse padrão de expressão também foi descrito em transformantes GFP de *Guignardia citricarpa* (Rodrigues et al. 2013), *Ustilagoidea virens* (Andargie et al. 2015) e *Phaeoacremonium aleophilum*

(Pierron et al. 2015). Já Islam et al. (2012) relatam a ocorrência de uma alta variação da expressão de DsRed em transformantes de *Fusarium oxysporum*.

A localização da proteína GFP foi estudada em transformantes de *Aspergillus nidulans* e mostrou-se presente em todo o citoplasma e no núcleo das células, porém não foi detectada nas mitocôndrias e vacúolos (Fernández-Ábalos et al. 1998). Já na observação de linhagens de *Fusarium verticillioides* marcadas com GFP e DsRed, a ausência de emissão da fluorescência restringiu-se aos vacúolos (Wu et al. 2016). Com isso, pode-se sugerir que a heterogeneidade na emissão de fluorescência durante as análises das hifas dos transformantes de *D. schini* esteja relacionada a locais onde estavam presentes essas organelas celulares.

A homogeneidade do sinal fluorescente foi obtida em transformantes de *Aspergillus carbonarius* utilizando uma versão melhorada da proteína verde fluorescente, a EGFP. Porém, nesse estudo observou-se uma variação na intensidade da fluorescência, com apenas 50 % dos transformantes mostrando-se verdes brilhantes (Crespo-Sempere et al. 2011).

Para avaliar o potencial de fungos endofíticos como agentes de controle biológico frente a fitopatógenos da videira tem sido utilizada a técnica de cultura pareada, que torna visível a atividade antagonista entre endófitos e fungos fitopatogênicos por meio da co-cultura *in vitro* (Brum et al. 2012; Felber et al. 2016). Como as linhagens de *D. schini* (B64-46 e C27-07) já demonstraram potencial no controle de fitopatógenos utilizando essa técnica (Felber et al. 2016), neste estudo o objetivo dela foi detectar se os transformantes mantiveram a sua capacidade de inibir os fitopatógenos *Alternaria* sp. e *Glomerella* sp., e assim verificar se a transformação poderia ter silenciado genes relacionados ao controle biológico ou, alternativamente, torna-se um marcador rastreável de linhagens a serem empregadas no controle de fitopatógenos.

Como no presente trabalho, outros estudos também avaliaram se a marcação de fungos com GFP e DsRed interfere na sua capacidade de inibir o crescimento de fitopatógenos. Santos et al. (2016) utilizaram a cultura pareada para avaliar a atividade antagonista de transformantes de *Diaporthe endophytica* e *D. terebinthifolii* frente ao fungo *Phyllosticta citricarpa*, um importante patógeno de citros. Semelhante ao resultado obtido no presente estudo, os transformantes testados não apresentaram diferença na atividade antagonista em relação às linhagens selvagens. O mesmo foi observado por Bitsadze et al. (2015) no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, em que foi avaliada a mortalidade de seus escleródios pela atividade micoparasítica. Nessa investigação os transformantes GFP de *Microsphaeropsis ochracea* e DsRed de *Coniothyrium minitans* não diferiram das linhagens selvagens em relação ao potencial de controle biológico. Porém, os dois estudos citados relatam também que os

transformantes não apresentaram diferenças morfológicas e fisiológicas em relação às linhagens selvagens.

Em conclusão, o presente estudo descreveu pela primeira vez a transformação genética de duas linhagens de *Diaporthe schini* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* pela inserção de genes marcadores para fluorescência. A transformação foi bem-sucedida, altamente reprodutível e acredita-se que os transformantes obtidos poderão ser aplicados em diversos estudos futuros, incluindo a prospecção gênica de interesse biotecnológico. Além disso, a expressão estável das proteínas fluorescentes GFP e DsRed permitirá realizar o monitoramento dos mecanismos de colonização desses endófitos no hospedeiro. Considerando também que os transformantes mantiveram sua atividade antagonística *in vitro* em relação aos fitopatógenos da videira, seu potencial no controle biológico pode ser avaliado por meio de seu rastreamento *in vivo*.

Agradecimentos

À Fundação Araucária (FA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida à Aretusa Cristina Felber. À EMBRAPA Uva e vinho por fornecer as linhagens de fungos fitopatogênicos. Ao Prof. Dr. Carlos Labate e a Prof^ª. Dr^ª. Maria Carolina Quecine Verdi pela concessão das linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* contendo os plasmídeos.

Referências

- Anco DJ, Kim S, Mitchell TK, Madden LV, Ellis MA (2009) Transformation of *Phomopsis viticola* with the green fluorescent protein. *Mycologia* 101:8538-8558
- Andargie M, Li L, Feng A, Zhu X, Li J (2015) Development of a GFP-expressing *Ustilaginoidea virens* strain to study fungal invasion and colonization in rice spikelets. *S Afr J Bot* 97:16-24
- Andolfi A, Mugnai L, Luque J, Surico G, Cimmino A, Evidente A (2011) Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3:1569-160
- Armesto C, Maia FGM, Abreu MS, Figueira AR, Silva BM, Monteiro FP (2012) Genetic transformation with the *gfp* gene of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee with blister spot. *Braz J Microbiol* 43(3):1222-1229
- Arnold AE (2008) Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. In: Carson WP, Schnitzer SA (eds) *Tropical Forest Community Ecology*. Hoboken: Wiley-Blackwell

- Ash GJ, Stodart B, Sakuanrungrasirikul S, Anschaw E, Crump N, Hailstones D, Harper JDI (2010) Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. *Mycologia* 102:54-61
- Badalyan SM, Innocenti G, Garibyan NG (2002) Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathol Mediterr* 41:200-225
- Bernardi-Wenzel J, Quecine Mc, Azevedo JL, Pamphile JA (2016) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium proliferatum*. *Genet Mol Res* 15(2)
- Bitsadze N, Siebold M, Koopmann B, von Tiedemann A (2015) Single and combined colonization of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia by the fungal mycoparasites *Coniothyrium minitans* and *Microsphaeropsis ochracea*. *Plant Pathol* 64:690-710
- Brum MCP, Araújo WL, Maki CS, Azevedo JL (2012) Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. *GMR* 11: 4187-4197
- Burruano S, Alfonzo A, Lo Piccolo S, Conigliaro G, Mondello V, Torta L, Moretti M, Assante G (2008) Interaction between *Acremonium byssoides* and *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera*. *Phytopathol Mediterr* 47:122-131
- Campanile G, Ruscelli A, Luisi N (2007) Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and in planta tests. *Eur J Plant Pathol* 117:237-246
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556
- Crespo-Sempere A, López-Pérez M, Martínez-Culebras PV, González-Candelas L (2011) Development of a green fluorescent tagged strain of *Aspergillus carbonarius* to monitor fungal colonization in grapes. *Int J Food Microbiol* 148:135-140
- De Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 16:839-842
- Eckert M, Maguire K, Urban M, Foster S, Fitt B, Lucas J, Hammond-Kosack K (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. *FEMS Microbiology Letters* 253:67-74
- Faostat (2013) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acessado 20 dezembro 2015
- Felber AC, Orlandelli RC, Rhoden AS, Garcia A, Costa AT, Azevedo JL, Pamphile JA (2016) Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. *Ann Microbiol* 66(2):765-775

- Fernández-Ábalos JM, Fox H, Pitt C, Wells B, Doonan JH (1998) Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 27:121-130
- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc Agrotec (UFLA)* 35(6):1039-1042
- Fitzgerald AM, Mudge AM, Gleave AP, Plummer KM (2003) *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycol Res* 107:803-810
- Frandsen RJN (2011) A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *J Microbiol Methods* 87:247-262
- Glass NL, Donaldson G (1995) Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *App Environ Microbiol* 61: 1323-1330
- Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW (2013) *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi *Persoonia* 31: 1-41
- Gomès E, Coutos-Thévenot P (2009) Molecular aspects of grapevine pathogenic fungi interactions. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*, 2nd edn Springer Dordrecht Heidelberg London New York, pp 407-428
- González V, Tello ML (2011) The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Divers* 47:29-42
- Guido MAD, Pollastro S, Carlucci A, Angelini RMDM, Faretra F (2003) *Phomopsis viticola* is easily transformed with hph and Bmlr genes. *J Plant Pathol* 85:43-52
- Henson JM, Butler MJ, Day AW (1999) The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Ver Phytopathol* 37: 447-471
- Hewitt WB, Pearson RC (1988) *Compendium of Grape Diseases*. In: Pearson RC, Goheen A (eds) *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN
- Isaka M, Jaturapat A, Rukseree K, Danwisetkanjana K, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y (2001) Phomoxanthones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *J Nat Prod* 64: 1015-1018
- Islam MN, Nizam S, Verma PK (2012) A highly efficient *Agrobacterium* mediated transformation system for chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* using DsRed-Express to follow root colonisation. *Microbiol Res* 167:332-338
- Janus D, Hoff B, Hofmann E, Kück U (2007) An efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene. *Appl Environ Microbiol* 73:962-970
- Jiang C, Cheng X, Cheng Q, Huang M, Xu L (2014) High-efficiency transformation of the plant pathogenic fungus *Marssonina brunnea*. *J Plant Pathol* 96(3):459-464

- Karunakaran M, Nair V, Rho H, Choi J, Kim S, Lee Y (2008) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. *J Microbiol Biotechnol* 18:234-241
- Katoh K, Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform* 9: 286-298
- Kobayashi H, Meguro S, Yoshimoto T, Namikoshi M (2003) Absolute structure, biosynthesis, and anti-microtubule activity of phomopsidin, isolated from a marine derived fungus *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* 59: 455-459
- Kück U, Hoff B (2010) New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi *Appl Microbiol Biotechnol* 86:51-62
- Larrainzar E, O'Gara F, Morrissey JP (2005) Applications of autofluorescent proteins for *in situ* studies in microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 59:257-277
- Li S, Ridenour JB, Kim H, Hirsch RL, Rupe JC, Bluhm BH (2013) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the soybean pathogen *Phomopsis longicolla*. *J Microbiol Methods* 92:244-245
- Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, Sawyer TL, Redman RS, Rollins JA, Wolpert TJ, Johnson KB, Rodriguez RJ, Dickman MB, Ciuffetti LM (2001) Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Appl Environ Microbiol* 67:1987-1994
- Maor R, Puyesky M, Horwitz BA, Sharon A (1998) Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol Res* 102(4):491-496
- Michielse CB, Hooykaas PJJ, Van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics. *Curr Genet* 48:1-17
- Mikkelsen L, Sarrocco S, Lübeck M, Jensen DF (2003) Expression of the red fluorescent protein *DsRed-Express* in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiol Lett* 223:135-139
- Mostert L, Crous PW, Petrini O (2000) Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52:46-48
- Mullins ED, Kang S (2001) Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cell Mol Life Sci* 58(14):2043-2052
- Muniz CR, Silva GF, Souza Jr, Freire FCO, Kema GHJ, Guedes MIF (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of gummosis in cashew nut plants. *Genet Mol Res* 13(2):2906-2913
- Musetti R, Vecchione A, Stringher L, Borselli S, Zulini L, Marzani C, D'ambrosio M, Sanità di Toppi L, Pertot I (2006) Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathol* 96:689-698

- Niño-Sánchez J, Tello V, Casado-del Castillo V, Thon MR, Benito EP, Díaz-Mínguez JM (2015) Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Front Microbiol* 6:234
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evol Biol Centre, Uppsala University.
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogen Evol* 7: 103-116
- Pamphile JA, Azevedo JL (2002) Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*. L). *World J Microbiol Biotechnol* 18:391-396
- Paparu P, Macleod A, Dubois T, Coyne D, Viljoen A (2009) Efficacy of chemical and fluorescent protein markers in studying plant colonization by endophytic non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates. *BioControl* 54:709-722
- Pearson RC, Goheen AC (1994) Compendium of Grape Diseases. In: Hewitt WB, RC Pearson (eds) American Phytopathological Society, St. Paul, MN
- Petrini O (1991) Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews J, Hirano SS (eds) *Microbial ecology of leaves*, New York: Springer Verlag, pp 179-197
- Pierron R, Gorfer M, Berger H, Jacques A, Sessitsch A, Strauss J, Compant S (2015) Deciphering the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a gfp marked strain and cutting systems. *PLoS ONE* 10(6): e0126851.
- Raeder U, Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1:17-20
- Rambaut A (2009) FigTree v1. 3.1: Tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Acessado 23 Dezembro 2015
- Reis MC, Fungaro MHP, Duarte RTD, Furlaneto L, Furlaneto MC (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Microbiol Methods* 58:197-202
- Rhoden SA, Garcia A, Azevedo JL, Pamphile JA (2013) In silico analysis of diverse endophytic fungi by using ITS1-5,8S-ITS2 sequences with isolates from various plant families in Brazil. *Genet Mol Res* 12:935-950
- Rodrigues MBC, Fávaro LCL, Pallu APS, Ferreira A, Sebastianes FS, Rodrigues MJC, Spósito MB, Araújo, WL, Pizzirani-Kleiner AA (2013) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*: An efficient tool to gene transfer and random mutagenesis. *Fungal Biol* 117(7-8):556-568

- Rolland S, Jobic C, Fe`vre M, Bruel C (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Curr Genet* 44:164-171
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biol* 61(3):539-542
- Santos PJC, Savi DC, Gomes RR, Goulin EH, Senkiv CC, Tanaka FAO, Almeida AMR, Galliterasawa L, Kava V, Glienke C (2016) *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa* *Microbiol Res* 186-187:153-160
- Santos JM, Correia VG, Phillips AJL (2010) Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biol* 114: 255-270
- Sarrocco S, Falaschi N, Vergara M, Nicoletti F, Vannacci G (2007) Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots. *J Plant Pathol* 89(1):47-54
- Schoch, CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, et al. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109(16):6241-6246
- Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycol Res* 109:661-686
- Sebastianes FLS, Lacava PT, Fávoro LCL, Rodrigues MBC, Araújo, WL, Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner, AA (2012) Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, an endophytic fungus found in mangrove forests, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Genetics* 58(1):21-33
- Smith D, Onions AHS (1983) The preservation and maintenance of living fungi. Page Bros, Norwick
- Udayanga D, Liu X, Crous PW, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Hyde KD (2012) A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Divers* 56:157-171
- Uecker FA (1988) A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. Contributions from the U.S. National Fungus Collection. *Mycologia Memoir* 13: 9-12
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R (2011) SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27(2): 171-180
- Vesterlund SR, Helander M, Faeth SH, Hyvönen T, Saikkonen K (2011) Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. *Fungal Divers* 47:109-118.

Wagner BL, Lewis LC (2000) Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Appl Environ Microbiol* 66:3468-3473

White TJ, Bruns TD, Lee S and Taylor JW (1990) PCR Protocols: a guide to methods and applications. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics*, Academic Press, San Diego, pp 315-322

Wu L, Conner LR, Wang X, Xu R, Li H (2016) variation in growth, colonization of maize, and metabolic parameters of gfp- and DsRed-labeled *Fusarium verticillioides* strains. *Phytopathol* 106(8): 890-899

Zhang A, Lu P, Dahl-Roshak AM, Paress PS (2003) Efficient disruption of a polyketide synthase gene (pks1) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol Genet Genom* 268:645-655

Tabela 1. Fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* isolados das cultivares de videira Bordô e Concord e sequências com maior identidade quando alinhadas no banco de dados do GenBank (NCBI).

Fungos	Genes	Sequências com maior identidade	% Identidade	Número de Acesso
<i>Diaporthe</i> sp. (B64-46)	ITS	<i>Diaporthe terebinthifoli</i> CBS 133180	99 %	KC343216.1
	TUB	<i>Diaporthe schini</i> CBS 133181	99 %	KC344159.1
	TEF1	<i>Diaporthe schini</i> CBS 133181	98 %	KC343917.1
<i>Diaporthe</i> sp. (C27-07)	ITS	<i>Diaporthe schini</i> CBS 133181	99 %	KC343191.1
	TUB	<i>Diaporthe schini</i> CBS 133181	97 %	KC344159.1
	TEF1	<i>Diaporthe schini</i> CBS 133181	99 %	KC343917.1

Tabela 2. Atividade antagonística do fungo endofítico *Diaporthe schini* (B64-46) e seus transformantes contendo o gene *gfp* em relação à fungos fitopatogênicos da videira.

Fungos	Índice de antagonismo (%)	
	<i>Alternaria</i> sp. (CNPUV 674)	<i>Glomerella</i> sp. (CNPUV 378)
<i>D. schini</i> (B64-46)	35,96 ^{a*}	39,45 ^a
GFP 1	36,41 ^a	43,84 ^a
GFP 2	41,02 ^a	48,99 ^a
GFP 3	40,44 ^a	45,27 ^a
GFP 4	37,44 ^a	52,35 ^a
GFP 5	37,13 ^a	45,42 ^a
GFP 6	39,95 ^a	51,48 ^a
GFP 7	36,31 ^a	51,66 ^a
GFP 8	39,34 ^a	47,50 ^a
GFP 9	37,60 ^a	52,68 ^a
GFP 10	37,00 ^a	45,07 ^a
Controle	00,00 ^b	00,00 ^b

*Médias das triplicatas seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). Controle: placas inoculadas somente com discos de fitopatógenos.

Tabela 3. Atividade antagonística do fungo endofítico *Diaporthe schini* (C27-07) e seus transformantes contendo o gene *DsRed-Express* em relação à fungos fitopatogênicos da videira.

Fungos	Índice de antagonismo (%)	
	<i>Alternaria</i> sp. (CNPUV 674)	<i>Glomerella</i> sp. (CNPUV 378)
<i>D.schini</i> (C27-07)	37,64 ^{a*}	38,28 ^a
DsRed 1	37,20 ^a	42,71 ^a
DsRed 2	37,62 ^a	44,56 ^a
DsRed 3	40,65 ^a	41,17 ^a
DsRed 4	40,00 ^a	45,01 ^a
DsRed 5	40,00 ^a	42,42 ^a
DsRed 6	39,13 ^a	45,88 ^a
DsRed 7	40,87 ^a	44,25 ^a
DsRed 8	40,65 ^a	42,55 ^a
DsRed 9	37,59 ^a	40,17 ^a
DsRed 10	38,26 ^a	39,66 ^a
Controle	00,00 ^b	00,00 ^b

*Médias das triplicatas seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). Controle: placas inoculadas somente com discos de fitopatógenos.

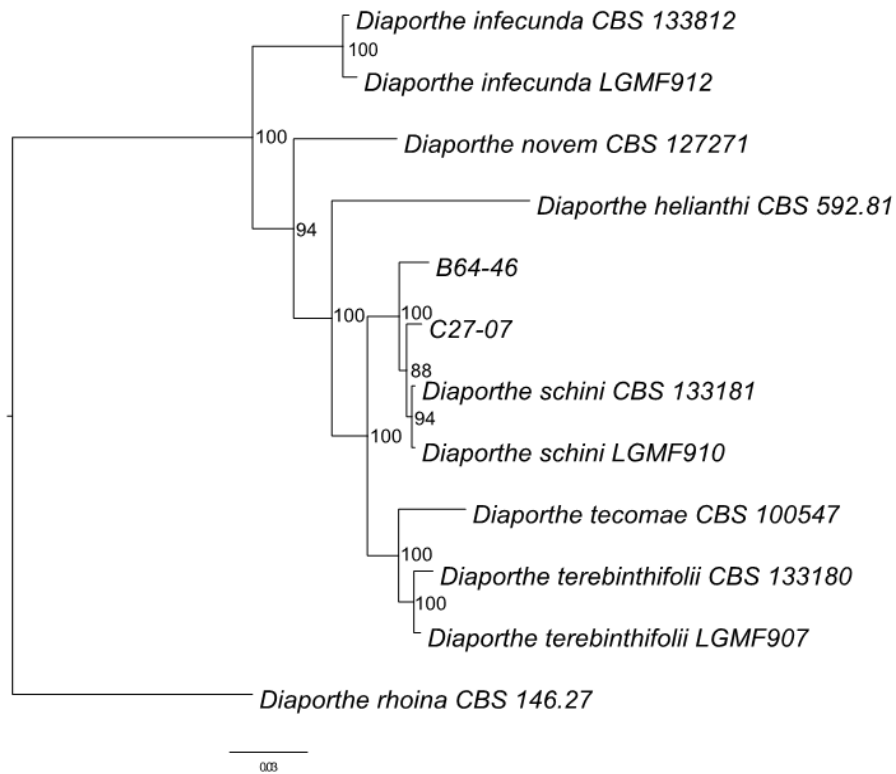


Fig. 1 Cladograma resultante da análise Bayesiana do alinhamento de três genes combinados (ITS, TEF1 e TUB). As probabilidades Bayesianas são demonstradas nos nós entre cada indivíduo. As sequências de *Diaporthe rhoina* CBS 146.27 foram utilizadas como grupo externo

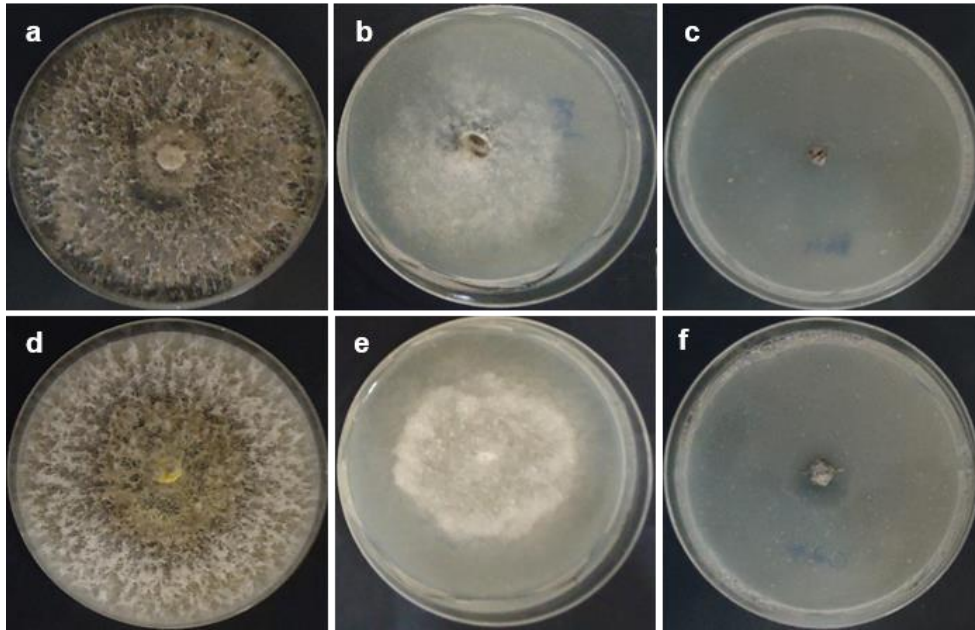


Fig. 2 Determinação da concentração mínima de higromicina B capaz de inibir o crescimento de *Diaporthe schini*. **a** Colônia de *D. schini* (B64-46) em meio BDA, **b** em meio BDA contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina B e **c** ausência de crescimento micelial em meio BDA com 25 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina B. **d** Colônia de *D. schini* (C27-07) em meio BDA, **e** em meio BDA contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina B e **f** ausência de crescimento micelial de *D. schini* (C27-07) em meio BDA com 25 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina B

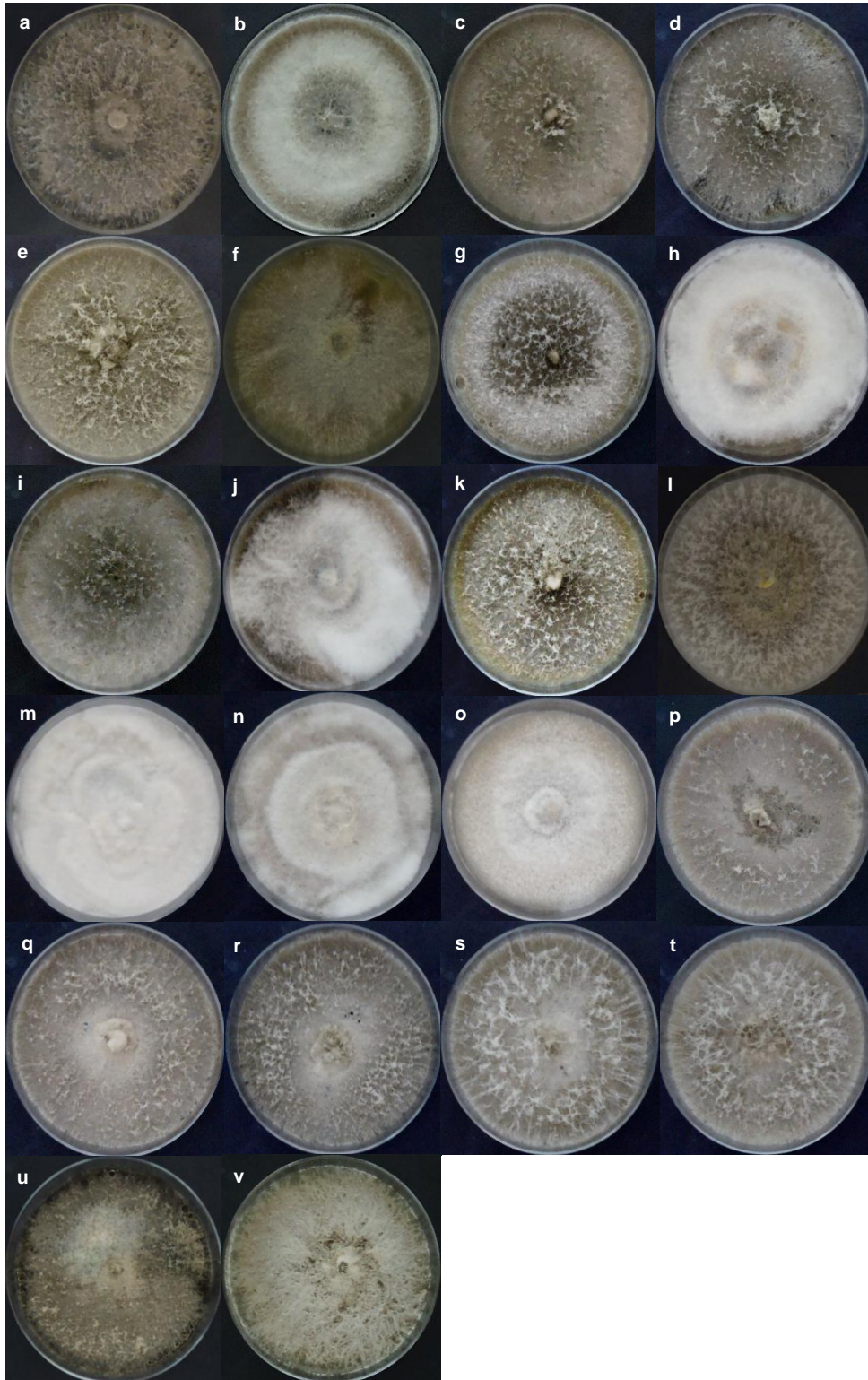


Fig. 3 Colônias de transformantes de *Diaporthe schini* cultivados em BDA suplementado com 25 µg/mL de higromicina B e incubados a 28 °C por 7 dias. **a** Colônia da linhagem selvagem de *D. schini* (B64-46). **b-k** Fenótipos de transformantes de *D. schini* (B64-46) portadores do gene *gfp*, GFP 1 a 10. **l** Colônia da linhagem selvagem de *D. schini* (C27-07). **m-v** Fenótipos de transformantes de *D. schini* (C27-07) portadores do gene *DsRed-Express*, DsRed 1 a 10

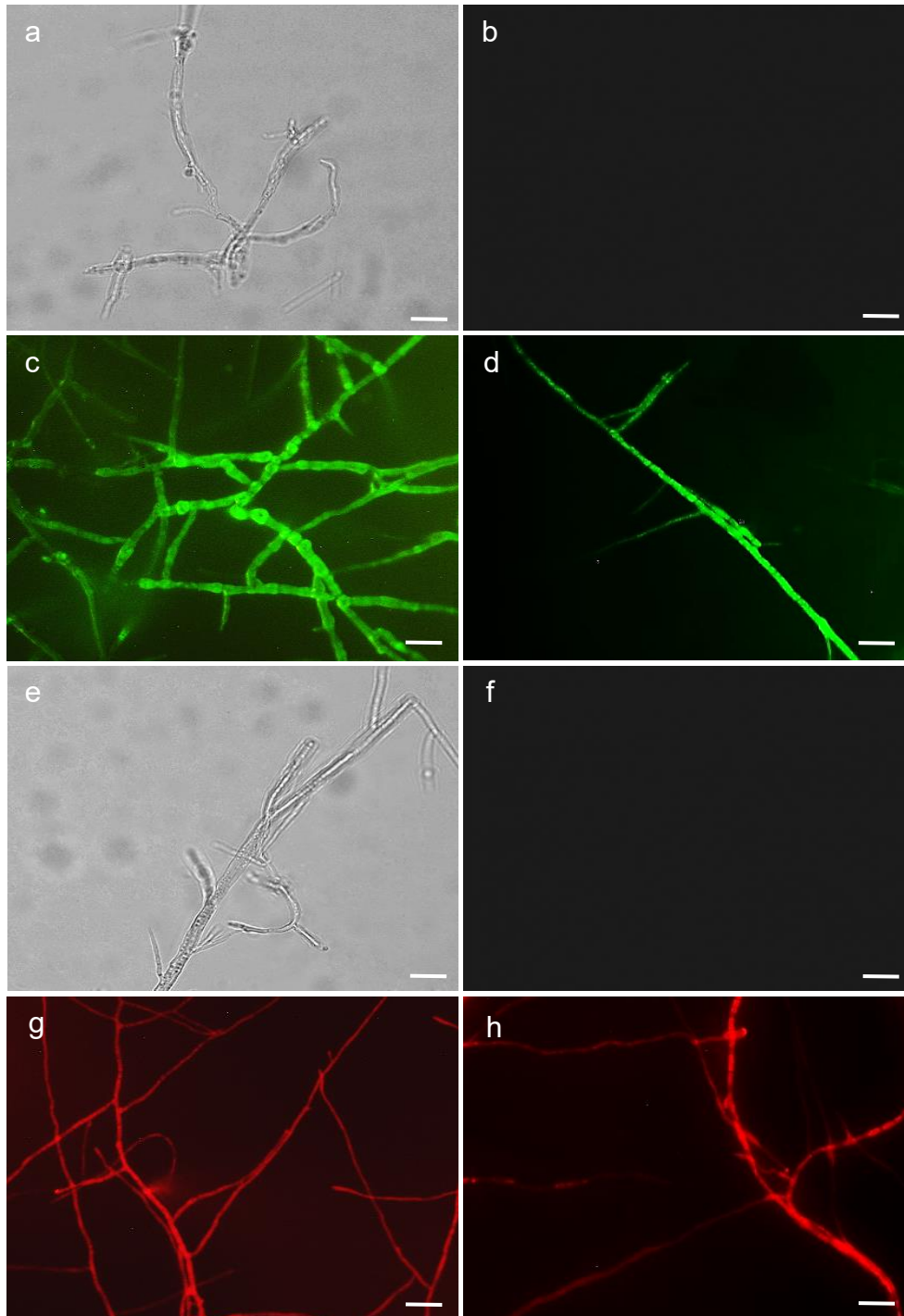


Fig. 4 Expressão das proteínas GFP e DsRed em *Diaporthe schini*. **a** Micélio de *D. schini* (B64-46) em campo claro e **b** em fluorescência. **c, d** Transformantes *D. schini* (B64-46) com expressão da fluorescência verde. **e** Micélio de *D. schini* (C27-07) em campo claro e **f** em fluorescência. **g, h** Transformantes *D. schini* (C27-07) com expressão da fluorescência vermelha. Bar = 10 μm

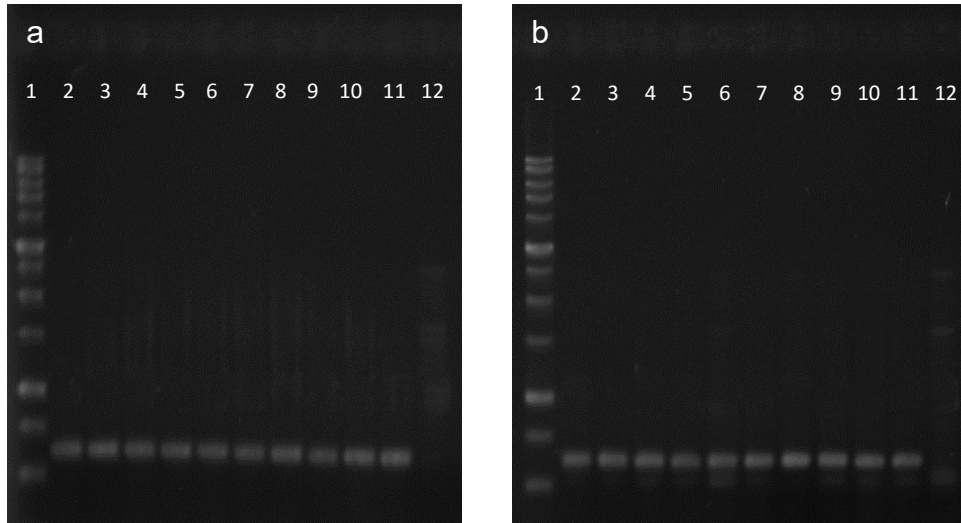


Fig. 5 Produtos da amplificação de um fragmento do gene *hph* com aproximadamente 600 pb utilizando os *primers* hph 1 e hph 2. **a** 1 DNA *latter* 1 kb; 2 a 11 transformantes contendo o plasmídeo pFAT-gfp; 12 fungo selvagem *Diaporthe schini* (B64-46). **b** 1 DNA *latter* 1 kb; 2 a 11 transformantes contendo o plasmídeo pCAMDsRed; 12 fungo selvagem *D. schini* (C27-07)

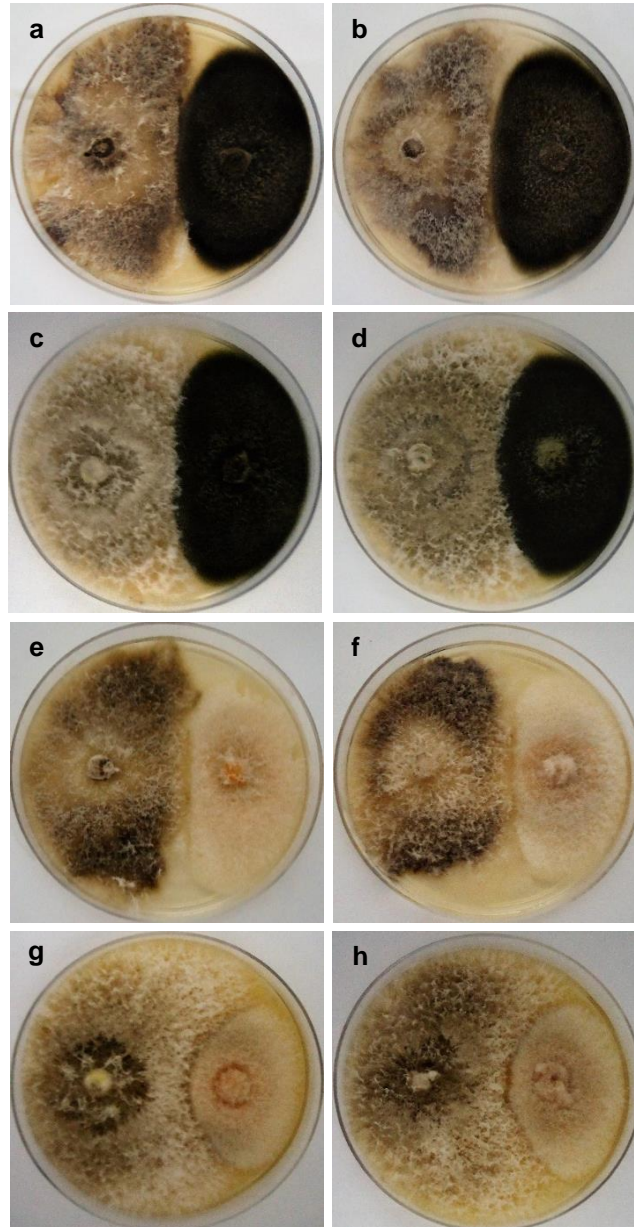


Fig. 6 Atividade antagonística das linhagens selvagens de *Diaporthe schini* e seus transformantes à fungos fitopatogênicos da videira. Antagonismo ao patógeno *Alternaria* sp. (CNPUV 674) (à direita nas placas): **a** *D. schini* (B64-46) (IA= 35,96 %), **b** transformante GFP 4 (IA=37,44 %), **c** *D. schini* (C27-07) (IA=37,64 %) e **d** transformante DsRed 7 (IA=40,87 %). Antagonismo ao patógeno *Glomerella* sp. (CNPUV 378) (à direita nas placas): **e** *D. schini* (B64-46) (IA=39,45 %), **f** transformante GFP 4 (IA=52,35 %), **g** *D. schini* (C27-07) (IA=38,28 %) e **h** Transformante DsRed 7 (IA=44,25 %)

ANEXO

CURRENT GENETICS
ISSN: 0172-8083 (print version)
ISSN: 1432-0983 (electronic version)

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Current Genetics publishes Reviews, Original Papers and Technical Notes. Manuscripts for Reviews are usually solicited by the Reviews Editor, but suggestions from authors are encouraged. All submitted manuscripts undergo a rigorous, fair and rapid peer-review.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Specific remarks

Please submit your manuscripts at <https://www.editorialmanager.com/cuge/>.

1. Prepare your manuscript exactly according to the author instruction
2. Go to <https://www.editorialmanager.com/cuge/> and log on using your User-ID and password. If you are a first-time user, click on “Register”. If you have forgotten your User-ID and/or password, click on “Send Username/Password”.
3. Go to the “Submit a Manuscript” and follow the instructions on screen that will guide you through a series of steps to enter all required information.
4. Upload your manuscript as a single Microsoft Word file or PDF file with all tables and figures inserted/imported. If this is not possible, submit text and figures as separate files. The system will guide you through steps to generate a single pdf file for reviewing purposes. Note that PDF files cannot be used for production of the accepted manuscript and source files are required at that stage. See further instructions how to prepare manuscript files below. No hard copy of the manuscript is required.
5. Peer reviewing will be supervised by the Editorial Office and an appropriate Associate Editor.
6. The Editorial Office will confirm your successful submission by E-mail and contact you as soon as a decision on your manuscript has been taken.

7. When you submit your revised manuscript, please upload ALL source files (even if some of them were not altered). If your manuscript is then accepted, those files will be used directly for production.

Original Articles and Technical Notes should be written using the following structure

Introduction

The introduction should guide the reader and hence contain the following:

- A short introduction to the field of research
- The scope and incentives of the work
- The background, i.e. previous work by your and other research groups strictly on the subject
- A conclusion summarizing the novelty and the significance of this paper.

Make sure that the introduction focuses on the background that is relevant for the data presented and the conclusions drawn.

Materials and Methods

This section should provide sufficient information to precisely evaluate how the data have been obtained, including the number of repetitions, and should permit a different research group to repeat the experimental work.

Results

Data should be presented as precisely and concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures.

Make sure not to repeat in the text values given in figures or tables.

The data presentation should follow a logical flow starting with a short description of the incentive of the experiment, followed by a description of the results. Do not repeat information on the experimental details; those belong to Materials and Methods. Describe and discuss the data, but interpretations and conclusions should be given in the Discussion.

Avoid combining Results and Discussion: separate Results and Discussion sections make for easier reading and a better structure of your article.

Discussion

The discussion should cover the following aspects:

- An interpretation of the results and their significance with reference to previous work.
- A description how the data advance the state-of-the-art
- The importance of the findings for the research field
- Any models realistically emerging from the data presented
- Implications for future research

Avoid repeating Introduction or Results.

Present your work so that it attracts the interest of referees and readers. This will increase the chances of acceptance and subsequent citation of the published work. Interest is attracted early on in the manuscript by highlighting the research questions addressed, the main results and conclusions derived from the work and their broader scientific impact.

For Review Articles authors should use a suitable structure of their choice. The manuscript should be broken down using informative headings. The Abstract and Introduction should be written so as to attract the reader and point out the broader impact and importance of the field covered.

LANGUAGE

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

Edanz Editing Global

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Genus and species names should be in italics.

Sequence/nucleotide data

New nucleotide data must be submitted and deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication.

Submission to any one of the three collaborating databanks is sufficient to ensure data entry in all. The accession number should be included in the manuscript e.g. as a footnote on the title page: 'Note: Nucleotide sequence data reported are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers(s)----'.

If requested the database will withhold release of data until publication.

The most convenient method for submitting sequence data is by World Wide Web:

EMBL via Webin: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>

GenBank via BankIt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>

DDBJ via Sakura: <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>

Alternatively, the stand-alone submission tool 'Sequin' is available from the EBI at <http://www3.ebi.ac.uk/Services/Sequin> and from NCBI at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>

For special types of submissions (e.g. genomes, bulk submissions etc) additional submission systems are available from the above sites.

Database Contact Information:

EMBL:

e-mail: datasubs@ebi.ac.uk

WWW URL: <http://www.ebi.ac.uk>

GenBank:

e-mail: info@ncbi.nlm.nih.gov

WWW URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

DDBJ:

e-mail: ddbj@ddbj.nig.ac.jp

WWW URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>.

Expression data

"Current Genetics" requires microarray data to be reported in accordance with the MIAME standards and this to be clearly documented in the Materials and Methods section. Please refer to <http://www.mged.org>. In addition, expression data should be deposited in a relevant repository such as:

Gene expression omnibus: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

EBI Microarray Databases: <http://www.ebi.ac.uk/Databases/microarray.html>

Center for Information Biology gene EXpression database: <http://cibex.nig.ac.jp/>

Submission should be documented in the manuscript.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

EndNote style (zip, 2 kB)

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title

Word Abbreviations, see ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format.

Msoffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black

and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material)

should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on there-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions.

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted.

Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the

Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-

Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to a more accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflict of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki

Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer’s online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative

Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

ENGLISH LANGUAGE SUPPORT

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.