



Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação - PPGEC

Instituto de Biologia - INBIO
Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul

**Estrutura da Comunidade de Fungos Endofíticos e
Bioprospecção de Isolados de *Aspilia grazielae* (Santos),
Espécie Vegetal Endêmica de Mato Grosso do Sul**

Carlos Eduardo Weirich



Campo Grande
Setembro 2020

**Estrutura da Comunidade de Fungos Endofíticos e
Bioprospecção de Isolados de *Aspilium grazielae* (Santos), Espécie
Vegetal Endêmica de Mato Grosso do Sul**

Carlos Eduardo Weirich

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ecologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Dra Maria Rita Marques
Co-orientadora: Dra Alinne Pereira de Castro

Agradecimentos

À prof. Dra. Maria Rita Marques pela orientação, ensinamentos, compreensão e amizade. Além de ser a melhor Master Chef mineira que conheci.

Ao prof. Dr. Fábio de Oliveira Roque que muito contribuiu para a finalização deste trabalho.

À prof. Dra. Alinne Pereira de Castro pela coorientação e grande ajuda nas análises de metagenômica.

Ao professor Dr. Dênis Pires de Lima, pelas conversas, troca de conhecimentos, ajuda nas traduções e pela amizade.

Aos professores do departamento PPGEC, por seus ensinamentos.

Aos professores do departamento de Bioquímica Fabiana Zanoelo Duoglas Masui, Carla Oliveira e Geovana Giannesi pelos ensinamentos.

À Clarice Rossato Marchetti pela sua amizade, paciência e ensinamentos e pela grande ajuda na identificação morfológica dos fungos endofíticos e nas realizações dos ensaios biológicos.

À Camila Silveira de Souza, por me convidar para participar das suas coletas de campo e principalmente pela grande ajuda na qualificação, você foi fundamental, meu muito obrigado.

À Micheli Soares de Lima, pela troca de conhecimento, pelos papos, pela ajuda na coleta de campo, e principalmente por me escutar nos desabafos de desespero (rsrsrs), muito, muito obrigado.

Às professoras Danielle Serra de Lima, Marci Sanabria, Sandra dos Santos Cereali e Yvelise Maria Possiede pelos altos papos aleatórios durante os cafézinhos.

Ao Rodenir Magalhães por ser essa pessoa chata (rsrs) e pelos papos durante os cafezinhos da manhã e da tarde.

A todos os colegas do laboratório de Bioquímica do INBIO. Em especial aos professores Jean Pierre Oses e Roberto Ruller, pelos ensinamentos.

À minha família, mesmo que de longe sempre me apoiou. Meu pai Dercio, minha mãe Odete e os meus irmãos Luiz Fernando (Nene) e Anna Paula, aos meus "cunhas" Julio César e Caroline e aos meus lindos sobrinhos Luiza e Benjamin. Amo todos vocês!!

À minha família do MS, seu Pedro, dona Cleide, Fabiana e Luciano, Elânio, Marina.

Ao meu grande amigo Aleixo, obrigado por tudo meu irmão, você me ajudou muito nesta jornada...quantas horas no telefone...quantos desabafos...quantos conselhos.... Valeu por tudo.

Aos professores membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para avaliação desta tese.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Católica Dom Bosco por ter disponibilizado o laboratório de biologia molecular.

Aos funcionários da Mineradora Vale S.A Rosilene Silva, Felipe Tadashi Coelho, Túlio Santos e Bruno Vasconcellos, que me auxiliaram nas coletas a campo.

À CAPES pela bolsa concedida, ao Museu Paraense Emilio Goeldi e ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC) pelos recursos para a realização das análises de metagenômica e a FUNDECT pelos recursos utilizados nos experimentos.

À UFMS e ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos do INBIO, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário importante de uma etapa da minha vida.

Índice

Resumo geral.....	6
General abstract	7
Introdução Geral	8
Capítulo I - Biodiversidade da comunidade de fungos endofíticos de uma espécie endêmica do Pantanal.....	20
Resumo	20
Abstract	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	25
Resultados	29
Discussão	40
Capítulo II - Biorremediação de Metais (Fe⁺²) e (Mn⁺²) por fungos endofíticos dos gêneros <i>Aspergillus spp</i> e <i>Penicillium spp</i> isolados de <i>Aspilia grazielae</i> (Santos).....	48
Resumo	48
Abstract	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	57
Resultados	63
Discussão	73
Conclusões.....	78
Capítulo III - Desenvolvimento de mudas de <i>Aspilia grazielae</i> (Santos) em solo inoculado com fungos endofíticos do gênero <i>Aspergillus sp</i> suplementado com solução de metais	81
Resumo	81
Abstract	82
Introdução.....	83
Material e Métodos.....	86
Resultados	92
Discussão	103
Conclusões.....	107
Conclusões gerais.....	108
Referências	108

Resumo geral

O uso de novas tecnologias para o estudo do DNA vem crescendo nos últimos anos. Essas mudanças iniciaram em 2005, com o surgimento das primeiras tecnologias conhecidas como NGS (Next Generation Sequencing), permitindo uma nova abordagem de sequenciamento em larga escala. Essas novas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases. Neste trabalho, utilizamos a plataforma Illumina MiSeq para investigar e comparar a estrutura da comunidade de fungos endofíticos da espécie vegetal *Aspilia grazielae*. Também utilizamos o método de plaqueamento de fragmentos vegetais (folhas e raízes) em meio BDA para isolamento de fungos endofíticos *in vivo*. Este trabalho foi dividido em três capítulos, que abordam aspectos relacionados à estrutura da comunidade dos fungos endofíticos e o seu potencial biotecnológico para biorremediação e bioprospecção. Foi investigado como a mineração influencia na estrutura da comunidade de fungos endofíticos de plantas crescidas em duas áreas, uma nativa e outra de recuperação (capítulo 1), o potencial biotecnológico para biorremediação de Fe^{+2} e Mn^{+2} pelos fungos que apresentaram maior tolerância e esses metais (capítulo 2), e a capacidade de três isolados do gênero *Aspergillus* em promover o crescimento de mudas de *Aspilia grazielae* (capítulo 3). De acordo com os resultados apresentados no capítulo 1, encontramos uma redução significativa do filo de Ascomycota na área de recuperação, indicando grande impacto do processo antropogênico nessa comunidade. Portanto, embora nosso estudo seja um instantâneo dessa comunidade complexa, sugerimos a importância de preservar a área nativa dos maciços do Pantanal, não apenas para conservar a biodiversidade da micobiota, mas também como fonte de comunidade endofítica da rizosfera para colonizar áreas de recuperação de atividades de mineração que poderiam ser fundamentais para o sucesso das iniciativas de restauração. No capítulo 2, no qual avaliamos o potencial de biorremediação pelos isolados do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, constatamos que o gênero *Aspergillus* se mostrou mais tolerante aos metais testados do que o gênero *Penicillium*. Contudo, para fins de biorremediação, os isolados de *Aspergillus* não foram tão eficientes na remoção dos metais em meio líquido quanto o gênero *Penicillium*. Um isolado do gênero *Penicillium* (CR1) mostrou ser o mais eficiente para remoção de metais, principalmente de Fe^{+2} , dentre todos os isolados testados, indicando que o mesmo apresenta um alto potencial para biorremediação de Fe^{+2} . Tais resultados sugerem que a cepa CR1 tem potencial para aplicabilidade na remediação de metais pesados de solos e águas poluídos. No capítulo 3, os resultados mostraram a capacidade dos isolados de *Aspergillus* em crescer em meio de cultura contendo soluções concentradas de Fe^{+2} e Mn^{+2} . Observou-se também que os isolados promoveram o crescimento vegetativo das mudas de *A. grazielae*, quando adicionados ao solo, atuando como bioestimuladores de crescimento, e com potencial para biofertilizantes em programas de agricultura sustentável. No entanto, mais estudos são necessários para propor a preparação de uma bioformulação indutora de crescimento, e revelar os mecanismos pelos quais estes fungos atuam.

General abstract

The use of new technologies for studying DNA has been growing over the last recent years. These changes began in 2005 with the emergence of the pioneering technologies known as NGS (Next Gen Sequencing), allowing a new approach to large-scale sequencing. These new technologies promote DNA sequencing on platforms capable of generating information on millions of base pairs. In this work, we used the Illumina MiSeq platform to investigate and compare the community structure of endophytic fungi of *Aspilia grazielae*. We also used the method of plating plant fragments (leaves and roots) in BDA medium to isolate endophytic fungi *in vivo*. This work was divided into three chapters which address aspects related to the community structure of endophytic fungi and their biotechnological potential for bioremediation and bioprospecting. It was investigated how mining influences the community of endophytic fungi from plants grown in two areas, a native and a recovery area (Chapter 1), the biotechnological potential for bioremediation of Fe^{+2} and Mn^{+2} by the fungi that showed greater tolerance and these metals (Chapter 2), and the ability of three isolates of the *Aspergillus* genus to promote the growth of *Aspilia grazielae* seedlings (Chapter 3). According to the results of Chapter 1, we found a significant reduction in the phylum of Ascomycota in the recovery area, indicating a great impact of the anthropogenic process in this community. Therefore, although our study is a snapshot of this complex community, we suggest the importance of preserving the native area of the Pantanal massifs, not only to conserve the biodiversity of mycobiota but also as a source of rhizosphere endophytic community to colonize areas of activity recovery mining companies that could be instrumental in the success of recovery initiatives. In Chapter 2, in which we evaluated the potential for bioremediation by isolates the genus *Aspergillus* and *Penicillium*, we found that the genus *Aspergillus* was more tolerant to the metals tested as the genus *Penicillium*. However, for the bioremediation purposes, *Aspergillus* isolate. Among all tested isolates, an isolate of the genus *Penicillium* (CR1) proved to be the most efficient for removing mainly Fe^{+2} . The result indicates the potential for applicability of the CR1 strain for the remediation of heavy metals from polluted soils and waters. In Chapter 3, the results convey the ability of *Aspergillus* isolates to grow in culture medium comprising concentrated solutions of Fe^{+2} and Mn^{+2} . It was also observed that the isolates when added to the soil, promoted the vegetative growth of *A. grazielae* seedlings, acting as growth biostimulators, with potential to act as biofertilizers in sustainable agriculture programs. However, further studies are needed to propose the preparation of a growth-inducing bioformulation and, to reveal the mechanisms by which these fungi act.

Introdução Geral

Conceito de holobionte e de fungos endofíticos

O termo “holobionte” foi descrito em 1991 por Lynn Margulis e René Fester, e inicialmente referia-se a um organismo envolvendo um hospedeiro e um único simbionte. Posteriormente foi estendido para definir um hospedeiro e suas comunidades de microrganismos (também conhecida como microbiota), que interagem de maneira mutualística e/ou parasitária. Assim, um hospedeiro e sua microbiota constituem um holobionte, sendo agora amplamente utilizado em diferentes contextos e se aplicam a praticamente todos os metazoários, com pesquisas atuais concentrando-se principalmente em holobiontes humanos, animais e vegetais (Simon et al. 2019).

Segundo Cannon (1997) e Arnold (2007), os fungos estão entre os grupos de organismos mais diversificados do planeta. Como é comum em grupos megadiversos, são também os menos conhecidos. Desde a descoberta dos microrganismos endofíticos em Darnel, Alemanha, em 1904 (Tan & Zou 2001), vários pesquisadores têm definido endofíticos de diferentes maneiras, dependendo da perspectiva de isolamento e estudo (Araújo et al. 2018). Segundo uma definição amplamente aceita, construída por Bacon e White (2000), os fungos endofíticos são microrganismos que colonizam tecidos internos de plantas sem causar qualquer efeito negativo imediato. Outros autores descrevem microrganismos endofíticos como aqueles que vivem de forma assintomática inter ou intracelular em tecidos vegetais, e são encontrados virtualmente em todas as espécies (Saikkonen et al. 2013; Pires et al. 2015; Lopes et al. 2017).

Microrganismos endofíticos estão divididos em dois grupos: o grupo I, engloba as espécies que não desenvolvem estruturas externas no hospedeiro, vivendo

todo o seu ciclo de vida nos órgãos internos das plantas, e o grupo II inclui espécies capazes de desenvolver estruturas externas no hospedeiro, tais como os fungos micorrízicos (Mishra et al. 2014).

Os endofíticos do grupo I apresentam uma grande variedade de hospedeiros e constituem o maior grupo de simbiontes, facilmente cultivados em meios de cultura artificiais, colonizando todas as plantas de ecossistemas naturais (Schulz et al. 2006; Petrini 1996). A maioria pertencente à classe dos Ascomycetos e seus anamorfos e à classe dos Basidiomycetos (Mishra et al. 2014).

Estima-se que existam mais de um milhão de fungos endofíticos sobrevivendo na natureza e acredita-se que toda as espécies de plantas são hospedeiras de um ou mais endofíticos (Joseph & Priya 2011; Strobel 2014; Jia et al. 2016). Os endofíticos são a principal fonte de compostos bioativos naturais, com potenciais aplicações em diferentes campos, como agricultura, indústria farmacêutica e alimentícia, bem como utilizados em fitorremediação, processos fermentativos e biotransformação (Ioca; Allard; Berlinck, 2014; Sudha et al. 2016).

Muitos estudos têm mostrado que os microrganismos podem estimular significativamente o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo de plantas (Angelard et al. 2010; Wijesooriya & Deshappriya 2016). Isto deve-se a capacidade dos mesmos em produzir substâncias estimulantes do crescimento, como vários fitormônios, além de aumentarem a absorção de nutrientes (Ignatova et al. 2013; Nutaratat et al. 2014).

Os fungos também desempenham diversos papéis benéficos, sendo que os endofíticos na sua interação com seu hospedeiro, atuam na proteção contra doenças, por meio da competição com fitopatógenos por sítios de colonização, e pela produção de antibióticos (Clarke et al. 2006, Ownley et al. 2010). Outra atividade

desempenhada por esses microrganismos está relacionada à proteção de plantas contra insetos herbívoros por meio da produção de toxinas (Crawford et al. 2010, Gange et al. 2012). Vários estudos apontam a atuação dos endofíticos no aumento da tolerância aos estresses abióticos (Hamayun et al. 2009, Khan et al. 2011, 2012).

Os endofíticos também produzem metabólitos secundários de interesse biotecnológico que estão sendo explorados antropicamente. A enorme capacidade destes fungos em adaptar-se aos diferentes ambientes, os torna um campo de estudo interessante na busca de novos metabólitos (Kusari et al. 2012, Saikkonen et al. 2013)

Interação fungo endofítico-planta

As parcerias planta-microrganismo estão relacionadas como uma via de mão dupla, principalmente por meio de associações entre a rizosfera (região do solo influenciada pelas raízes, com máxima atividade microbiana) e a raiz da planta, visando a sobrevivência em ambientes tóxicos ou com limitação de nutrientes (Abhilash et al. 2012; Begum et al. 2019).

A transmissão dos endofíticos ocorre primeiramente de maneira vertical, ou seja, a planta hospedeira passa os endofíticos para suas sementes e assim para a próxima planta. Os endofíticos desta classe frequentemente aumentam a biomassa vegetal, conferem tolerância à seca e produzem substâncias tóxicas para animais, auxiliando na diminuição da herbivoria, segundo Clay (1988).

Os fungos endofíticos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares, que funcionam como mecanismos de resistência contra invasão microbiana e na obtenção de nutrientes (Siqueira et al. 2012; Tavares et al. 2012; Barbosa et al. 2015).

Acredita-se que muitas substâncias bioativas que ocorrem nas plantas podem ser produzidas por estes microrganismos associados, porém a exata relação física e

bioquímica entre os endofíticos e as plantas ainda não foram totalmente elucidadas (Ramos et al. 2018; Silva 2018).

Os microrganismos endofíticos recebem nutrição e proteção do seu hospedeiro, proporcionando um aumento do *fitness* da espécie vegetal que o abriga, desta forma melhorando sua capacidade competitiva, aumentando sua resistência (Clarke et al. 2006; Ownley et al. 2010).

Algumas evidências indicam que os fungos endofíticos podem influenciar na dinâmica de populações, causando efeitos profundos na ecologia, influenciando na adaptação e evolução de plantas (Clay & Holah 1999), provocando mudanças no padrão e na estrutura das comunidades, bem como na diversidade de organismos associados, como bactérias, nemátodos e insetos (Omacini et al. 2001). Podem dessa forma, influenciar o próprio ecossistema (Arnold 2007, Mishra et al. 2014).

Fitorremediação e Micorremediação

O processo tecnológico de biorremediação utiliza sistemas biológicos para tratar sistemas poluídos e restaurar a qualidade ambiental por meio da degradação ou absorção de poluentes (Silva & Esposito 2010).

Dentre as inúmeras tecnologias para remediação de ambientes contaminados destaca-se a biorremediação, conceituada por Mueller et al. (1996) como “o processo pelo qual os resíduos orgânicos são biologicamente degradados sob condições controladas a um estado inócuo, ou para níveis abaixo dos limites de concentração estabelecida pelos órgãos reguladores”. É uma opção para promover a detoxificação do local ou a remoção de elementos contaminantes do solo ou de corpos d’água, utilizando processos ou atividades biológicas por meio de organismos vivos

(microrganismos, algas ou plantas superiores) que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes (Jacques 2010).

A remediação de ambientes utilizando plantas é chamado de fitorremediação, e vem demonstrando benefícios em comparação aos métodos físico-químicos tradicionais, uma vez que possibilita tanto a detoxificação através da imobilização, absorção ou acumulação (Marques et al. 2011) de resíduos perigosos, além de proporcionar a reconstituição do local degradado (Ashraf et al. 2011).

A fitorremediação está associada à capacidade das plantas de depositarem substâncias poluentes nos vacúolos, que podem ser transportados da raiz para outras partes das plantas através de vasos do xilema ou no uso de proteínas ou peptídeos complexantes conhecidos como fitocelatinas e metalotioneínas, ambas ricas em resíduos de cisteína, cujos grupos sulfidril (-SH) são capazes de se ligar a íons de metais pesados e formar complexos muito estáveis (Ali et al. 2013)..

As plantas também possuem enzimas específicas que desempenham papéis vitais no metabolismo dos Contaminantes de Interesse Emergente (CIE), e com o auxílio dessas enzimas, as plantas são capazes de desintoxicar os CIE em um processo conhecido como "fígados verdes" (Sandermann Jr 1992). Alguns desses contaminantes podem ser lipofílicos e são absorvidos e translocados por todo o tecido da planta e subsequentemente sofrem transformações químicas assistidas por enzimas.

As plantas capazes de tolerar altas concentrações de metais pesados são chamadas de hiperacumuladoras, e desenvolveram esta habilidade por meio de duas estratégias básicas (Ashraf et al. 2011, Bhargawa et al. 2012). A primeira estratégia é denominada acumulação, na qual o metal pode ser acumulado nas plantas, tanto em baixas quanto em altas concentrações e a segunda é conhecida como estratégia de

exclusão, onde o transporte de metais pesados para a parte aérea é limitado por uma gama de concentrações de metais no solo (McGrath et al. 2001).

Quando fungos estão envolvidos no processo de remediação, podemos definir a biorremediação realizada por eles como micorremediação, ou seja, a capacidade dos fungos do solo, micorrizas e fungos endofíticos de biorremediar áreas contaminadas. Diferentes mecanismos são adotados pelos fungos para a biorremediação, dentre eles os processos enzimáticos intra e extracelulares feitos por peroxidases, lacases, transferases e citocromo P450 (Figura 1) para desintoxicação e biodegradação ou mineralização (Deshmukh et al. 2016; Olicón-Hernández et al. 2017; De Lima et al. 2018). Além disso, pode ocorrer adsorção de xenobióticos na parede celular de fungos e armazenamento de metabólitos intermediários nas organelas dos fungos (Olicón-Hernández et al. 2017).

Os biossurfactantes também podem ser excretados por fungos, como os soporolipídios, os complexos de proteínas lipídios / polissacarídeos, glicolipídios e glicolipoproteínas. Essas moléculas têm porções hidrofílicas e hidrofóbicas que interagem entre fases de diferentes polaridades, resultando em reduções de tensão interfacial e aumentando a interação entre moléculas (Cicatiello et al. 2016; Günther 2017).

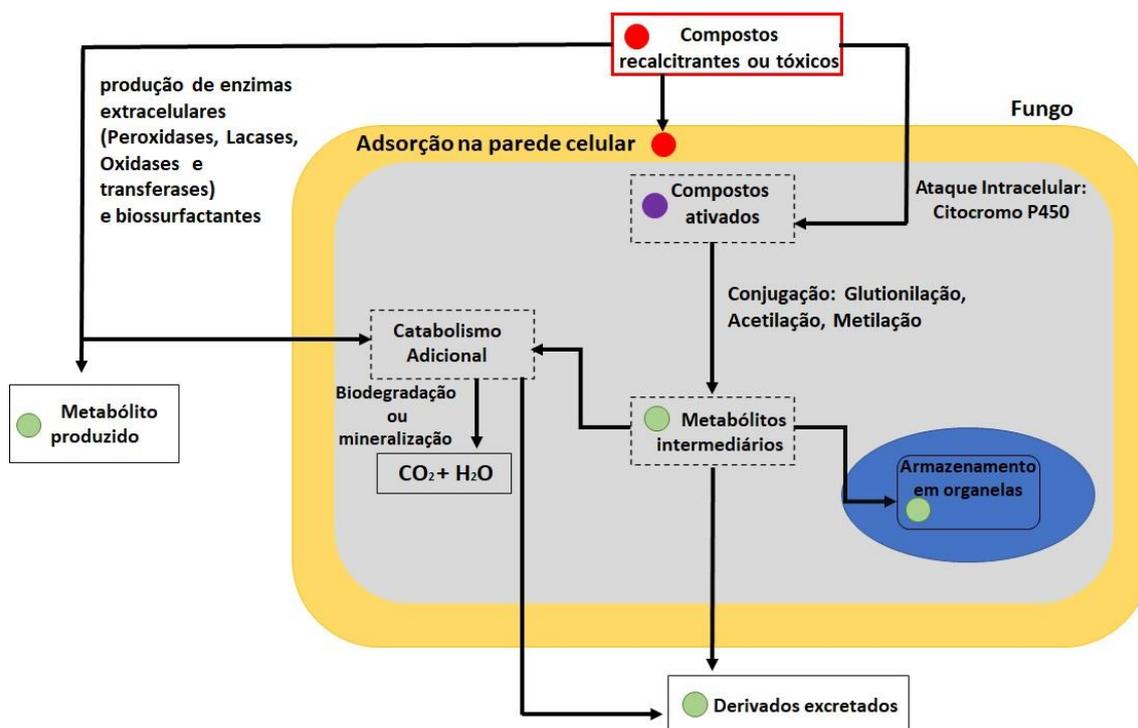


Figura 1. Mecanismos adotados por fungos para biorremediação de compostos tóxicos e recalcitrantes (Adaptado de Deshmukh et al. 2016 e Olicón-Hernández et al. 2017).

A contaminação do ambiente por metais pesados tem se tornado um problema global, que afeta a fertilidade do solo, a produtividade das culturas, e leva a bioacumulação desses elementos na cadeia alimentar (Rajkumar et al. 2009, Bhargawa et al. 2012).

O procedimento para remediação e consequente recuperação dessas áreas é lento e está relacionado à capacidade de restabelecimento do solo, onde se recompõem as características químicas, físicas e biológicas a um nível mínimo, que permita o desenvolvimento de espécies vegetais e da atividade microbiana, tão importante para o estabelecimento e sucessão da microbiota (Mendes Filho et al. 2010).

A ação dos microrganismos sobre os metais tem sido objeto de numerosos estudos, em virtude do seu potencial de aplicação, tanto para a detoxificação quanto para a recuperação de metais nas atividades da indústria de mineração (Schenberg

2010). Dependendo do estado de oxidação do metal pesado presente no ambiente, os microrganismos podem mobilizar ou imobilizar esse metal. A mobilização é feita através da biolixiviação, que é um mecanismo de solubilização bastante utilizado na mineração (Vullo 2003). Processos de biolixiviação utilizam microrganismos que são capazes de concentrar e recuperar os metais perdidos durante o processo de extração de minérios (Schenberg 2010).

As associações entre plantas e microrganismos metatolerantes tem recebido especial atenção devido ao potencial dos mesmos em bioacumular metais em ambientes poluídos, bem como seus efeitos sobre a mobilização/imobilização de metais. Por consequência, esta associação aumenta a absorção de metais e o crescimento das plantas, sendo que o uso sinérgico de plantas e microrganismos é favorável para a descontaminação de solos metálicos (Ma 2011). Ainda assim, mesmo que o microrganismo não tenha capacidade de tolerar o metal pesado, sua relação com a espécie vegetal permite à planta bioacumuladora/tolerante melhorar seu desenvolvimento no ambiente contaminado.

A tecnologia de biorremediação que utiliza apenas microrganismos para a degradação ambiental é norteadada por três princípios básicos: [1] presença do microrganismo com capacidade metabólica; [2] a disponibilidade do contaminante; [3] e as condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade microbiana (Andrade et al. 2010). Existem outras técnicas que auxiliam no processo de biorremediação por microrganismos (bioestimulação, bioventilação e a bioaugmentação). Portanto, para decidir qual a melhor técnica a ser empregada, além dos três princípios relatados acima, uma análise criteriosa e individual da área a ser remediada deve ser realizada (Andrade et al. 2010).

Espécie Aspilia grazielae (Santos) (Asteraceae)

A família Asteraceae (Dumortier) é o maior grupo vegetal dentre as Angiospermae (Judd et al. 2009). Estima-se que cerca da metade das espécies ocorrem no Novo Mundo, com registros de aproximadamente 250 gêneros e 2.000 espécies no Brasil, distribuídas em todo o território nacional (Souza & Lorenzi 2008).

Aspilia grazielae Santos (Asteraceae) é uma espécie endêmica das Morrarias do Urucum, Corumbá, MS. Nesta região encontra-se uma grande jazida de ferro e manganês, que tem sido explorada pela empresa Vale S.A. Foi observado que, embora esta espécie tenha ocorrência esparsa nas áreas de mata preservadas, ela consegue germinar em condições consideradas altamente estressantes para a maioria das espécies vegetais. Logo após a extração do ferro e manganês, a empresa mineradora devolve a camada de solo que foi retirada ao mesmo local. No entanto, a concentração de metais nestas áreas ainda permanece alta, sendo esta espécie capaz de germinar e crescer nestas condições (Damasceno, comunicação pessoal). É muito provável que a planta tenha desenvolvido mecanismos de adaptação ou evitação a altas concentrações destes minerais. Plantas com essas habilidades são hiperacumuladoras e altamente especializadas em acumular ou tolerar altíssimas concentrações de metais (Raskin et al. 1994). No entanto não encontramos informações desta natureza na literatura sobre *A. grazielae*. Esta espécie encontra-se na Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção, publicada pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA (2008).

Espécies vegetais que toleram ambientes inóspitos são de grande interesse para várias áreas das ciências biológicas por diferentes motivos. Primeiramente porque são importantes na recuperação de áreas degradadas que apresentam concentrações de poluentes a níveis tóxicos, como é o caso do Morro do Urucum.

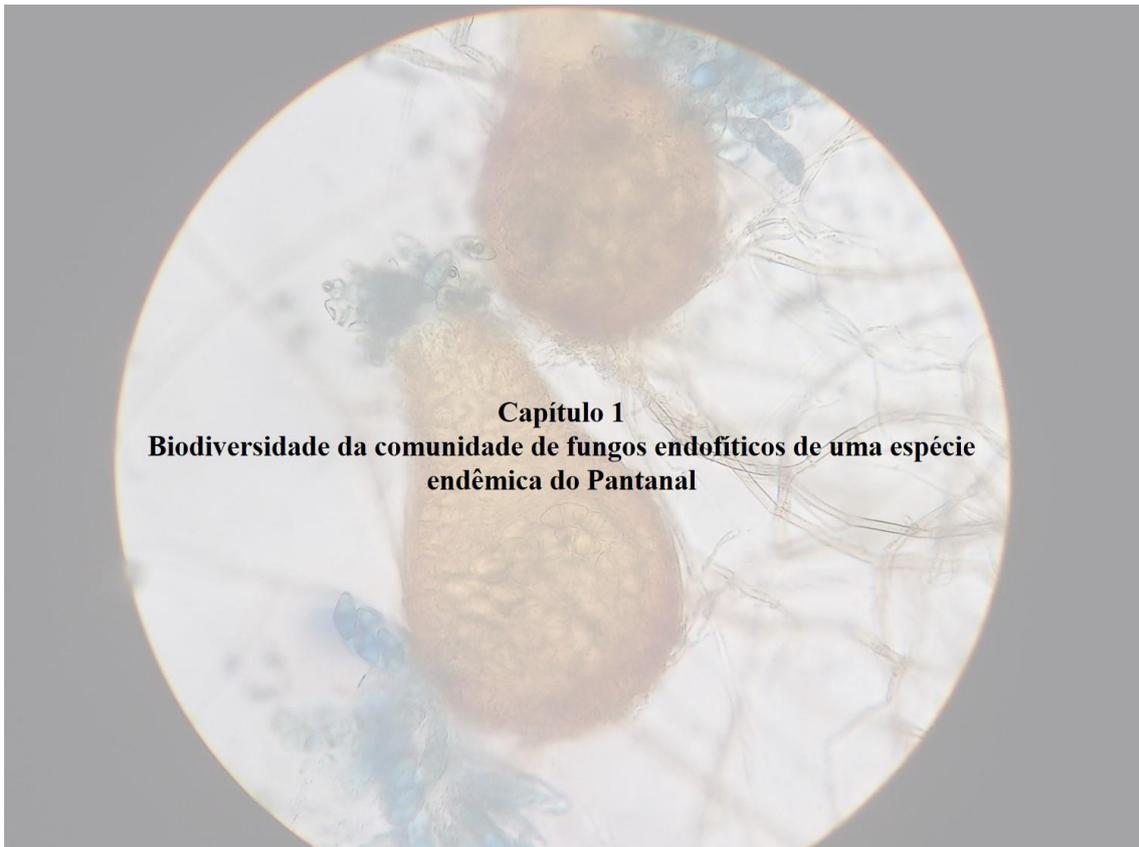
Aspilia grazielae tem sido efetivamente utilizada para recuperação de áreas recém exploradas para extração de ferro e manganês naquela região (Damasceno, comunicação pessoal). Além disso, é igualmente importante o conhecimento dos mecanismos físicos e/ou bioquímicos utilizados por esta espécie para tolerância ou acumulação de metais pesados, visando sua utilização em processos de biorremediação.

Diante do exposto, o Capítulo 1 deste trabalho apresenta um enfoque ecológico, onde avaliamos as comunidades endofíticas presentes nas folhas e raízes da espécie vegetal *Aspilia grazielae*, coletadas em duas áreas, uma nativa e outra de recuperação em uma região do Pantanal Sul Matogrossense. De acordo com nossos levantamentos em várias bases de dados, não há estudos sobre endófitos presentes nessa planta. Portanto, no Capítulo 1 tentamos responder, através do Sequenciamento de Nova Geração – Illumina, como estão estruturadas as comunidades de fungos endofíticos nesta espécie vegetal nas duas áreas e se essas comunidades foram influenciadas pelo extrativismo mineral.

No Capítulo 2, após um processo de triagem com os isolados endofíticos obtidos dos fragmentos vegetais (folhas e raízes), avaliamos a capacidade de dois grupos de fungos (*Aspergillus* e *Penicillium*) em biorremediar os metais ferro e manganês em meio de cultura líquido. Acreditamos que esses fungos podem ter relação com o desempenho desta espécie vegetal em tolerar altas concentrações de metais, sendo capazes de promover a biorremediação de metais.

No Capítulo 3, investigamos o potencial de promoção de crescimento e de biorremediação de três isolados do gênero *Aspergillus* inoculados em solo onde foram, posteriormente, cultivadas mudas de *A. grazielae*. A hipótese é de que os fungos endofíticos podem promover o desenvolvimento das plantas sendo utilizados

como bioestimulantes de crescimento. Assim buscamos avaliar se os isolados selecionados foram capazes de contribuir para o desenvolvimento da planta em estudo e ao mesmo tempo proteger a planta do input diário de soluções de ferro e manganês.



Capítulo 1
Biodiversidade da comunidade de fungos endofíticos de uma espécie
endêmica do Pantanal

Gênero *Viridispora* sp. isolado da raiz de *Aspilia grazielae*

Biodiversidade da comunidade de fungos endofíticos de uma espécie endêmica do Pantanal

Resumo

Aspilia grazielae (J.U. Santos) é uma espécie endêmica do Morro do Urucum do bioma Pantanal (Brasil). Essa região possui grandes jazidas de ferro e manganês, as quais são exploradas para atividade de mineração. Foram realizadas análises metagenômicas das comunidades de fungos endofíticos associados a folhas e raízes de áreas de vegetação nativa (NVA) e áreas de recuperação (RCA) com o objetivo de examinar a variação da diversidade destas comunidades. Para este propósito, foi utilizado o Sequenciamento de Nova Geração – Illumina para comparação das amostras, servindo como um guia de detecção e posterior desaparecimento das espécies não nativas. As Unidades Taxonomicas Operacionais (OTUs) de fungos detectadas nas amostras de folhas variaram entre 183 a 263 em NVA e de 200 a 282 em RVA. Nas raízes, variou entre 115 e 285 em NVA e de 156 a 348 em RCA. As comunidades foram mais abundantes e diferentes nas raízes do que nas folhas. A maior abundância dos fungos endofíticos em RCA pode estar relacionada à alta resiliência das espécies fúngicas aos distúrbios ambientais, bem como à dinâmica de origem dos propágulos nas diferentes áreas. Associações particulares entre comunidades endofíticas de fungos e *A. grazielae* sob diferentes condições de crescimentos revelam a importância da preservação da vegetação nativa do Pantanal.

Palavras-Chave: *Aspilia grazielae*, metagenômica, Pantanal, espécies endêmicas, interferência antropogênica, metais pesados

Biodiversity of endophytic fungi communities from an endemic plant species from Pantanal wetland

Abstract

Aspilium grazielae (J. U. Santos) is an endemic species to Morro do Urucum at Pantanal wetland (Brazil). Metagenomic analyzes of endophytic fungi communities associated with leaves and roots from areas of native vegetation (NVA) and recovery areas (RCA) were carried out in order to examine the variation in the diversity of these communities. For this purpose, the New Generation Sequencing - Illumina was used to compare the samples, serving as a guide for detection and subsequent disappearance of non-native species. The Operational Taxonomical Units (OTUs) of fungi detected in the leaf samples ranged from 183 to 263 in NVA and from 200 to 282 in RCA. In the roots, it varied between 115 and 285 in NVA and from 156 to 348 in RCA. The communities were more abundant and different in the roots than in the leaves. The greater abundance of endophytic fungi in RCA may be related to the high resilience of fungal species to environmental disturbances, as well as to the dynamics of propagule origin in different areas. Particular associations between endophytic communities of fungi and *A. grazielae* under different growth conditions reveal the importance of preserving the native vegetation of the Pantanal.

Keywords: *Aspilium grazielae*, metagenomics, Pantanal wetland, endemic species, anthropogenic interference, heavy metals.

Introdução

O Pantanal é um bioma localizado no centro da América do Sul, no Alto da Bacia do Paraguai (Junk et al. 1989). A exploração excessiva e a falta de manejo deste bioma têm ameaçado sua biodiversidade (Alho & Silva 2012, Tomas et al. 2019). Nos próximos anos, atividades de mineração e de agricultura podem levar a impactos ecológicos muito negativos (Roque et al. 2016; Tomas et al. 2019). É uma situação lamentável, já que o conhecimento dos microrganismos associados às plantas do Pantanal ainda é muito escasso (Noriler et al. 2018). Entre estas comunidades, fungos endofíticos associados a espécies vegetais são particularmente importantes, pois apresentam uma forte relação simbiótica, estimulando o crescimento vegetal (Cardinale 2014; Mendes & Raaijmakers 2015; Strobel et al. 2017) e contribuindo na defesa contra predadores e patógenos (Bragina et al. 2014; Grube et al. 2015; Martin et al. 2017). Adicionalmente, estes fungos podem contribuir significativamente nos ciclos de carbono e nitrogênio e podem atuar na biorremediação de xenobióticos (Thapa & Prasanna, 2018). Portanto, o entendimento da associação entre comunidades fúngicas e espécies vegetais do Pantanal é fundamental para compreender o efeito e as mudanças causadas pelo uso da terra, seu manejo ou a associação de ambos. É uma tarefa urgente para o uso sustentável da biodiversidade naquela região.

Comunidades endofíticas são ubíquas na natureza e são essenciais para a adaptação de seus hospedeiros a ambientes específicos, como é caso das áreas de recuperação de áreas de mineração. Fungos endofíticos crescem assintomaticamente, dentro dos tecidos das plantas, tais como folhas, caules e raízes, e são proeminentes mutualistas, aumentando a absorção de nutrientes por meios físicos e químicos (Peay et al. 2016). Estudos relacionados à diversidade de fungos endofíticos mostram que

uma única planta pode ser colonizada por mais de 1.000 espécies de fungos, sendo a maioria delas não cultiváveis em meios de cultura sintéticos (Thapa & Prasanna, 2018). A rizosfera tem sido estudada há mais de 100 anos (Philippot et al. 2013) e atualmente a endosfera tem sido objeto de intensa pesquisa, com o intuito de buscar o controle de patógenos e predadores de plantas (Hardoim et al. 2015; Martin et al. 2017; Vorholt 2012). Considerando que fungos endofíticos de áreas de recuperação pós-mineração têm forte relação simbiótica com a planta e que estão relacionados com o estímulo do crescimento e sanidade do hospedeiro, muitos estudos são atraídos para este tema (Cardinale 2014; Grube et al. 2015; Mendes & Raaijmakers 2015; Martin et al. 2017).

As associações que ocorrem entre as plantas e microrganismos metatolerantes tem recebido especial atenção, devido ao potencial dos microrganismos em bioacumularem metais em ambiente poluído, bem como seus efeitos sobre a mobilização/imobilização de metais, e por consequência, aumentando a absorção de metais, proporcionando o crescimento das plantas (Glick, 2010; Ma, 2011). Ainda assim, mesmo que o microrganismo não tenha capacidade de tolerar o metal pesado, sua relação com a espécie vegetal permite à planta bioacumuladora/tolerante melhorar seu desenvolvimento no ambiente contaminado.

Atividades de mineração à céu aberto afetam os sistemas geoquímicos, biológicos e hidrológicos, causando degradação do solo e dano à vegetação (Faucon et al. 2016; Cross et al. 2017). Estudos acerca da associação entre comunidade de fungos endofíticos e plantas são usados para auxiliar a aceleração dos processos de recuperação de áreas de mineração. Espécies vegetais são holobiontes, dependem das comunidades endofíticas e epifíticas presentes na rizosfera, endosfera e filosfera para sobreviver. A composição das comunidades microbianas associadas a cada

hospedeiro depende da estrutura das comunidades da planta inteira (Peršoh 2015).

A. grazielae (Astereaceae) é uma espécie arbórea-arbustiva, endêmica da flora brasileira (Santos 2001; Hind & Miranda 2008). É encontrada tipicamente em uma região de transição entre os biomas Cerrado e Pantanal. Esta espécie está ameaçada pelo avanço das atividades de mineração no Pantanal, o que causa um declínio contínuo da qualidade do seu habitat (CNCFLORA 2015; Flora do Brasil Online 2020).

Estudos sobre *A. grazielae* estão limitados somente a listas de verificação e seu endemismo (Santos 2001; Farinaccio et al. 2018). Esta espécie está incluída na lista vermelha das espécies com risco de extinção (Brasil 2014; Roque et al. 2018). No entanto, *A. grazielae* tem sido utilizada pela empresa mineradora Vale S.A. para recuperação de áreas degradadas (Skiryicz et al. 2014; Vieira et al. 2018).

Acreditamos que o processo de extração mineral irá influenciar na comunidade endofítica, diminuindo a diversidade de fungos endofíticos nos indivíduos de *A. grazielae* da área de recuperação, onde os distúrbios ambientais ocasionados pela remoção do solo e vegetação diminuem a diversidade da comunidade endofítica, enquanto que na área nativa, pela estabilidade e adaptação das plantas, a diversidade dos endofíticos será maior.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar duas facetas de biodiversidade fúngica (riqueza e composição de espécies) influenciadas pelo efeito das alterações antropogênicas do extrativismo mineral na comunidade de fungos endofíticos de folhas e raízes de *A. grazielae*. Selecionamos duas áreas, uma denominada área de recuperação (RCA), onde houve a retirada total da vegetação e posteriormente revegetação da espécie vegetal em estudo, e outra área nativa, sem alteração da vegetação, denominada área de vegetação nativa (NVA).

Material e Métodos

Área de estudo

O alto da Bacia do Paraguai é uma região de transição entre os grandes biomas da América do Sul: Pantanal, Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Chaco, Bosque Chiquitano e remanescentes da Caatinga (Pott et al. 2012; Graciolli et al. 2017). A vegetação é bastante variável, compreendendo principalmente florestas sazonais (decíduas e semidecíduas), formações rochosas no topo das colinas, vegetação laterítica, florestas ripárias inundadas pelo Rio Paraguai e florestas inundadas associadas com as baías negras (Pott et al. 2011; Pott et al. 2012; Bortolloto et al. 2015).

As amostras vegetais e de solo foram coletadas em março de 2015 no Morro do Urucum, localizado nas áreas urbanas das cidades de Corumbá e Ladário, no Estado de Mato Grosso do Sul, nas coordenadas S19°18'44.2", W57°61'125" (RCA) e S19°17'85.2" W57°60'22.4" (NVA) (Fig.1).

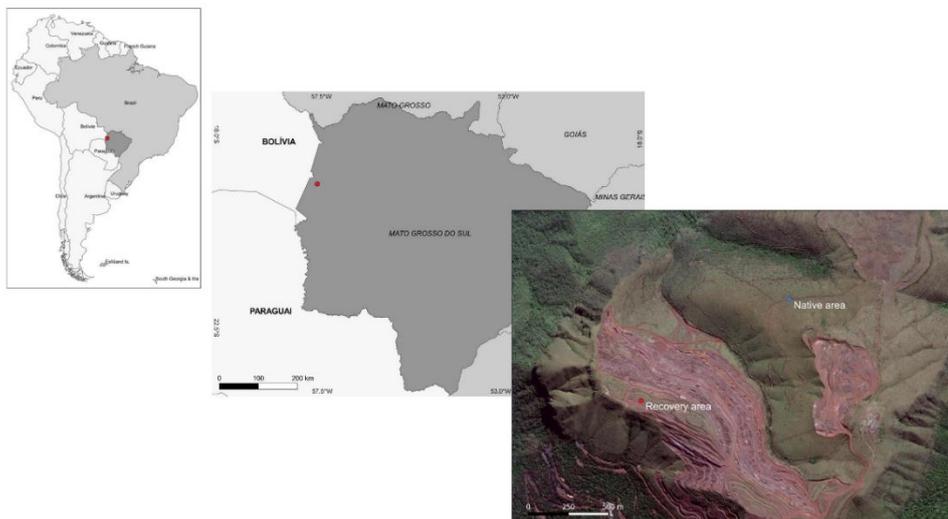


Fig 1. Mapa das duas áreas onde foram coletadas as amostras de *A. grazielae*, na cidade de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.

As altitudes variam entre 500 e 1000 metros e são caracterizadas pela

presença de conglomerados de rochas formadas por granitos, gnaisses, calcários e micaxistos (Haralyi e Walde 1986). O clima é classificado com metamórfico tropical, com temperatura média anual de 25,1°C e umidade relativa anual de 76,8%. A média de precipitação é de 1.070 mm, com a ocorrência da estação chuvosa entre os meses de novembro a março, enquanto os períodos secos ocorrem entre junho e agosto. Na região em foco, os principais tipos de solo são litossolos e cambissolos eutróficos. A área de vegetação nativa (NVA) possui uma cobertura vegetal densa e preservada. A região é explorada economicamente para mineração a céu aberto, para extração de ferro e manganês. A extração de ferro é feita com a remoção total da vegetação e da camada superficial do solo (Vieira et al. 2018).

Coleta das amostras de plantas e solo

Cinco indivíduos de *A. grazielae* foram coletados em cada área avaliada. Foram coletados ramos e raízes de cada indivíduo em um raio de 100 metros entre uma planta a outra para reduzirmos a variação intra-específica. As plantas apresentaram aspecto saudável, sem sintomas aparentes de doença. As amostras foram embaladas em sacolas plásticas, identificadas por área e acondicionadas em caixas térmicas para transporte até o laboratório. Uma amostra testemunha foi depositada no Herbário CGMS da UFMS após identificação botânica e registrada como amostra UFMS nº 59308.

Foram coletadas amostras de solo das duas áreas avaliadas, em uma profundidade de 0-20 cm, para caracterização das propriedades físico-químicas. Para obter uma amostra representativa das áreas de interesse, foram amostrados diferentes locais de cada área. Todas as amostras foram identificadas e armazenadas imediatamente em sacos plásticos e transportadas em caixas térmicas até o

laboratório. Uma porção do solo foi peneirada (2 mm de abertura) e homogeneizada para análise granulométrica (argila, areia e silte; Teixeira et al., 2017) e das propriedades químicas de acordo com o método Mehlich Raij et al. (2001).

Pré-tratamento das amostras vegetais

Antes da extração do DNA genômico, cada indivíduo coletado foi separado em folhas e raízes e lavado com água corrente até remoção total de areia e solo. Em seguida, o material foi identificado e armazenado a -18°C até a extração do DNA.

Folhas e fragmentos de raízes de 10 cm de cada planta foram escolhidos ao acaso e os microrganismos epifíticos foram removidos por desinfecção superficial com água destilada estéril durante 20 segundos. Em seguida, foram lavados, sob agitação em uma solução de hipoclorito de sódio 3% durante 10 minutos, imersão em etanol 70% por 30 segundos, lavagem com água destilada estéril por três vezes e finalmente as amostras foram secadas sob condições estéreis (Pereira et al. 1993; Araujo et al. 2001). As folhas e raízes foram cortadas em fragmentos de 0,5 cm e maceradas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido.

Extração do DNA genômico, amplificação por PCR e sequenciamento do rDNA 18S

A extração do DNA genômico das amostras de folhas e raízes de *A. graziellae* foi realizada segundo metodologia descrita por Ferreira e Grattapaglia (1998) e Al-Bulushi et al. (2017), com adaptações.

O sequenciamento pelo sistema MiSeq Illumina foi realizado para as vinte amostras. O sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) para a comunidade fúngica foi realizada a partir da extração do DNA genômico. Amostras de DNA isolados de folhas e raízes foram armazenadas a -20°C até a amplificação por PCR. Os primers utilizados foram longos porque o primer 5.8_Fun inclui: RC do

adaptador Illumina 3' (CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT) mais Barcode Golay (CGTACCAGATCC) mais Pad do iniciador reverso (AGTCAGTCAG) mais linker do iniciador reverso (GG) mais 5.8S_Fun (AACTTTYRRCAAYGGATCWCT). Além disso, para o iniciador ITS4_Fun foram incluídos: adaptador Illumina de 5' (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC) mais Primer Pad (TATGGTAATT) mais Primer Linker (AA) mais ITS4_Fun (AGCCTCCGCTTATTGATATGCTTAART) (White et al. 1990). O sequenciamento da extremidade pareada (2 x 250 pb) foi realizado usando o sequenciador Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA).

As leituras das sequencias brutas foram filtradas, seguindo os parâmetros padrão. As leituras limpas foram sobrepostas e reunidas em sequencias consenso (ou seja, tags), utilizando o programa de Ajuste Rápido de Comprimento de Leituras Curtas, versão 1.2.11 (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH>). As tags foram posteriormente agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com uma sequencia de identidade de 97% como limite usando UPARSE (<http://www.drive5.com/uparse>), e as quimeras foram filtradas usando UCHIME, versão 4.2.40 (<http://drive5.com/uchime>). As OTUs foram classificadas taxonomicamente pelo Ribosomal Database Project Classifier versão 2.2 (<http://rdp.cme.msu.edu>); referenciando o banco de dados UNITE ITS (<https://unite.ut.ee>), usando 0,6 de valores de confiança como ponto de corte (Nilsson et al. 2019).

Os dados do sequenciamento Illumina obtidos neste trabalho estão disponíveis no NCBI Sequence Read Archive sob o número **SUB6178275**.

Análises estatísticas

Os testes estatísticos das diferenças taxonômicas entre raízes e folhas da área nativa e da área de recuperação foram calculados pelo teste t (igual variância) com o tipo frente e verso usando o software Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP), versão 2.0.0 (Parks and Beiko, 2010). As diferenças estatísticas entre amostras foram baseadas em uma medida da distância no gráfico PCoA e comparadas usando o teste de similaridade (ANOSIM) por troca de grupo com 999 réplicas.

O coeficiente de dissimilaridade de Bray-Curtis, uma medida da beta diversidade, também foi calculado para avaliar a dissimilaridade das amostras dentro e entre amostras de raízes e folhas. Foi selecionada da medida de dissimilaridade de Bray-Curtis porque esta não leva em consideração a distância filogenética (como matriz ponderada e não ponderada do UniFrac) entre grupos amostrados, sendo o coeficiente de similaridade mais utilizado na ecologia clássica.

Foi realizado uma Análise de Componentes Principais (PCA) para avaliar se a atividade de mineração alterou as características físico-química do solo entre as áreas. Os dados brutos foram transformados usando a seguinte equação:

$$Z = \frac{\text{escore bruto} - \text{média}}{\text{desvio padrão}}$$

Resultados

Análises do solo

Foram coletadas 7 amostras de solo para cada uma das áreas avaliadas. As características físicas e químicas de cada amostra estão apresentadas na Tabela 1. Os resultados encontrados nas amostras foram utilizados para análise de covariância dos componentes principais.

Tabela 1. Características das propriedades físico-químicas do solo da da área de vegetação nativa (NVA) e de recuperação (RCA).

Parâmetros	NVA							RCA						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
M.O. (mg/dm ³)	54,2	62,9	110,9	75,2	55,6	60,1	48,4	16,3	24,2	15,7	14,2	34,5	5,3	27,3
pH (em H ₂ O)	4,5	4,5	4,2	4,1	4	4,5	4,7	4,7	4,6	4,3	4,4	4,1	4,6	4,9
P (mg/dm ³)	5	7	10	9	5	6	3	4	10	3	2	2	2	11
K (mg/dm ³)	129,5	135,6	170,9	126,2	90,5	155	104,8	56,1	40,8	57,5	23,9	88	17,5	93,8
Ca mmol (g/dm ³)	28	19	44	28	9	32	39	11	13	4	3	4	3	30
Mg mmol (g/dm ³)	7	7	13	6	3	9	7	3	4	1	1	1	1	9
H+Al mmol (g/dm ³)	70	93	158	133	88	73	54	27	44	30	36	93	19	37
Al mmol (g/dm ³)	7	11	16	16	17	7	3	2	5	5	4	17	2	1
S.B mmol (g/dm ³)	37	30	62	37	14	46	48	16	20	6	4	7	5	41
CTC mmol (g/dm ³)	107	123	219	171	102	119	102	43	64	37	40	100	23	78
V %	35	24	28	22	14	38	47	37	31	17	10	7	20	53
m %	16	26	21	30	54	14	6	12	21	44	51	72	30	3
SO ₄ (mg/dm ³)	21	19	7	6	5	4	8	13	7	27	27	9	5	5
B (mg/dm ³)	0,54	0,2	0,56	0,49	0,56	0,55	0,48	0,41	0,17	0,45	0,44	0,63	0,24	0,48
Cu (mg/dm ³)	0,96	0,97	1	1,27	0,88	0,42	1,2	0,31	0,2	0,38	0,61	0,27	0,14	0,53
Fe (mg/dm ³)	74,6	169,1	124,3	104,5	65,5	46,3	56,5	23,3	32,8	15,5	16,5	32,6	21,1	22,3
Zn (mg/dm ³)	0,52	1,26	1,1	0,86	0,6	0,42	0,27	0,38	1,67	0,21	0,24	0,21	0,19	0,92
Mn (mg/dm ³)	22,9	30,8	46,6	48,6	22,3	11,7	9,4	11,4	104,0	14,8	14,8	5,0	4,7	24,2
Argila (g/dm ³)	321	459	424	423	424	477	442	197	276,8	332	267	430	164	191
Areia (g/dm ³)	474	331	363	366	402	287	342	591	520,1	438	519	328	720	599
Silte (g/dm ³)	205	209	213	211	174	236	216	212	202,2	230	214	242	115	210

*M.O – Matéria orgânica; pH – Potencial hidrogeniônico; P – Fósforo; - K – Potássio; Ca – Cálcio; Mg – Magnésio; H+Al – Hidrogênio/Alumínio; Al – Alumínio; S.B. – Soma de bases ; CTC – Capacidade de troca catiônica ; V – saturação de bases; m – saturação por alumínio ; SO₄ - Sulfato de enxofre; B – Boro; Cu – Cobre; Fe – Ferro; Zn – Zinco; Mn – Manganês;

A análise de covariância dos componentes principais (PCA) foi realizada para todas as amostras do solo a fim de detectar similaridade entre as áreas NVA e RCA (Fig 2). A análise da similaridade mostrou que a estrutura geral do solo entre as áreas NVA e RCA diferiu entre os grupos (ANOSIM $p < 0,002$; Fig. 2). A porcentagem da variância total observada entre os componentes foi de 46,96% para PC1 e de 22,37% para PC2.

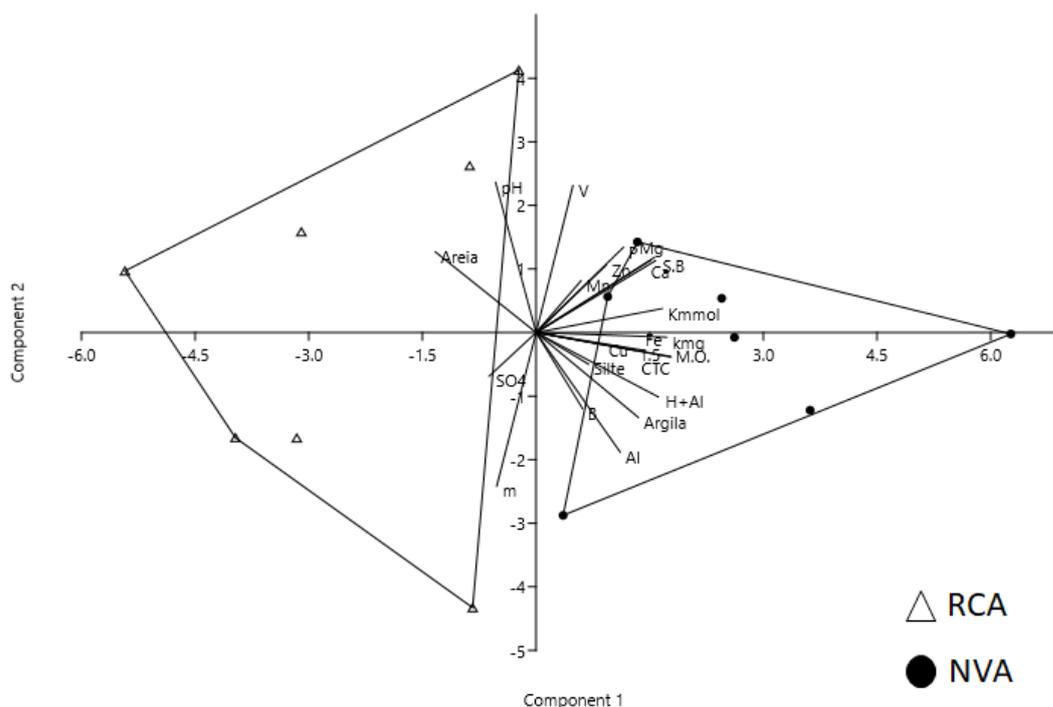


Fig. 2 Análise dos Componentes Principais (PCA), baseada na matriz de variância, descrevendo o solo das áreas NVA e RCA.

Diversidade das comunidades

O número total de sequências da região ITS após normalização dos dados foi 1.136.278, correspondendo a 4.611 unidades taxonômicas operacionais (OTUs). As OTUs detectadas nas amostras individuais variaram entre 183 a 263 nas folhas em NVA e entre 200 a 282 nas folhas da RCA. Por outro lado, os resultados variaram entre 115 a 285 OTUs em raízes da NVA e entre 156 a 348 na RCA (Tabela 2). De

acordo com os dados das OTUs, a estimativa do Índice de Diversidade de Shannon, Simpson e Chao1 revela que não houve diferença significativa quando se compara folhas e raízes entre as áreas avaliadas (Tabela 2).

Table 2 Número de sequencias, OTUs observadas e diversidade alfa de fungos endofíticos de indivíduos de *A. graziellae*

Amostras	Nº de Sequencias	OTUs Observadas	Chao1	Shannon	Simpson
L NVA 1	19648	235	235	5.67	0.97
L NVA 2	22964	263	263	5.30	0.94
L NVA 3	11258	184	184	5.14	0.94
L NVA 4	7112	183	183	5.50	0.96
L NVA 5	21636	210	210	4.61	0.90
L RCA 1	12658	200	200	4.76	0.92
L RCA 2	42270	273	273	5.03	0.93
L RCA 3	43518	282	282	5.53	0.96
L RCA 4	31382	256	256	4.70	0.90
L RCA 5	15672	238	238	5.34	0.94
R NVA 1	3772	127	127	4.74	0.89
R NVA 2	45918	115	115	0.88	0.19
R NVA 3	23870	214	214	4.94	0.93
R NVA 4	120926	285	285	3.33	0.75
R NVA 5	26486	249	249	5.05	0.94
R RCA 1	3592	156	156	5.66	0.96
R RCA 2	85436	308	308	4.38	0.89
R RCA 3	26716	261	261	5.06	0.93
R RCA 4	409484	224	224	1.44	0.43
R RCA 5	161960	348	348	3.08	0.71

* L NVA – Folha da Área de Vegetação Nativa, L RCA – Folha da Área de Recuperação, R NVA – Raiz da Área de Vegetação Nativa, R RCA – Raiz da Área de Recuperação

As curvas de rarefação de todas as amostras de *A. graziellae* mostraram uma tendência de aproximação do platô de saturação (Fig. 2). Neste sentido, a abundância de OTUs foi maior nas amostras de folhas em ambas as áreas avaliadas.

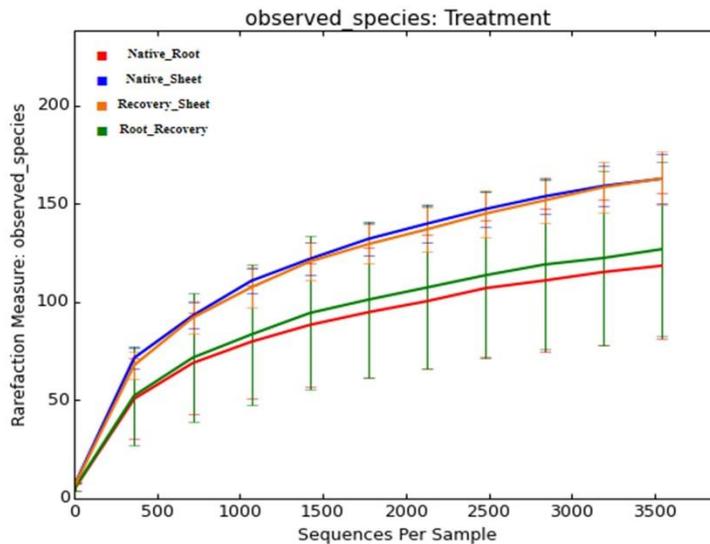


Fig. 2. Curva de rarefação do número de OTUs de espécies de fungos endofíticos observadas contra o número de amostras (5 replicatas por amostra) em cada área estudada. As amostras foram compostas por raízes nativas (RNVA), raízes de recuperação (RRCA), folhas nativas (LNVA) e folhas recuperação (LRCA).

As OTUs foram atribuídas a 4 filos de fungos, 14 classes, 41 ordens, 79 famílias, 176 gêneros nas amostras de raiz, e 3 filos, 15 classes, 35 ordens, 66 famílias e 137 gêneros nas amostras de folhas. Membros do filo *Ascomycota* foram os mais comuns entre todas as amostras de plantas, com 63,3% e 53,3% de abundância relativa (AR) presentes nas folhas e raízes respectivamente, seguido por *Basidiomycota* com 0,8% e 2,6% de AR, presentes nas folhas e raízes respectivamente. Por outro lado, *Zygomycota sensu lato* (0,2% e 0,6%) e *Glomeromycota* (0,0% and 0,1%) foram raras e acidentais (Fig. 3).

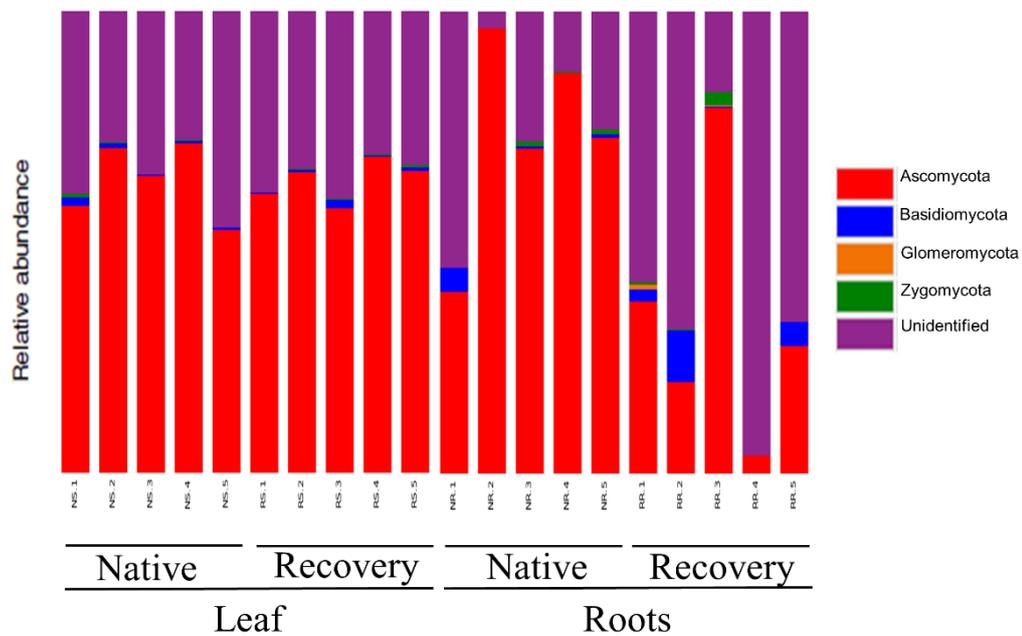


Fig. 3: Filiação taxonômica à nível de filo de seqüências ITS de fungos endofíticos em folhas e raízes de *A. grazielae*, crescendo em solo de vegetação nativa e de recuperação de uma região de transição entre os biomas Cerrado e Pantanal

O diagrama de Venn ilustra a distribuição das comunidades de fungos endofíticos nas raízes e folhas de amostras de *A. grazielae* (Fig. 4). Comunidades de fungos específicas foram maiores nas amostras de raiz em RCA, com 23,4%; já NVA apresentou 15,9%; sendo que 1,6% das OTUs são igualmente compartilhadas por ambas as áreas. Comparando amostras de folhas, a variação das OTUs foi de 16,9% nas folhas de RCA e 12,5% nas folhas de NVA e 2,8% foram compartilhadas por ambas as áreas.

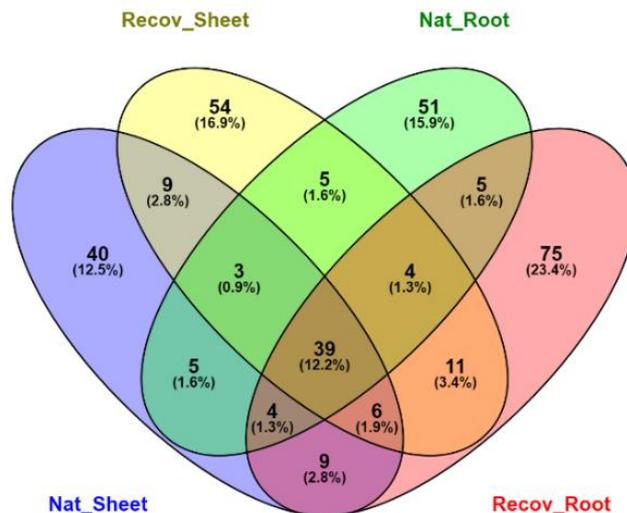


Fig. 4: Diagrama de Venn mostrando o grau de sobreposição das OTUs de fungos entre folhas e raízes de *A. graziellae* coletadas em NVA e RCA. Recov_Sheet (folhas da área de recuperação); Nat_Root (raiz da área nativa); Nat_Sheet (folhas da área nativa); Recov_Root (raiz da área de recuperação)

Composição da comunidade de fungos endofíticos

A análise revelou a diversidade de fungos endofíticos encontrada nas 10 amostras de raiz. Foram encontradas 116 OTUs nas amostras da NVA e 153 OTUs nas amostras da RCA. As OTUs mais representativas presentes nas amostras de raiz da NVA foram *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Cladosporium*. *Penicillium* foi o gênero dominante entre as amostras de raiz da área nativa, apresentando uma abundância relativa (AR) de 20,3% e uma AR de 8,9% nas raízes da RCA. *Trichoderma* também apresentou uma alta AR nas raízes da NVA, com 11,6% das sequências e somente 0,7% das sequências na RCA. O gênero *Fusarium* apresentou homogeneidade entre as amostras, com AR de 4,1% tanto na NVA quanto na RCA. O mesmo perfil foi observado no gênero *Cladosporium*, cuja AR foi de 1,8% e 1,9% em NVA e RCA, respectivamente. *Phomopsis* mostrou uma representatividade superior nas amostras de raiz da RCA com AR de 3,1% e de somente 0,1% na NVA.

O gênero *Aspergillus* mostrou uma AR de 0,9% e 1,2% na NVA e RCA, respectivamente.

A microbiota do tecido foliar da planta hospedeira também foi explorada. Foram encontradas 115 OTUs nas amostras de folhas da NVA e 131 OTUs das amostras do mesmo tecido da RCA. Entre as OTUs, os gêneros mais representativos foram *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Mycosphaerella* e *Leptosphaerulina*. Os gêneros *Penicillium* (11,9% e 9,7%) e *Trichoderma* (10,5% e 12,2%) foram predominantes entre as amostras de folhas da área nativa e de recuperação respectivamente (Fig. 5).

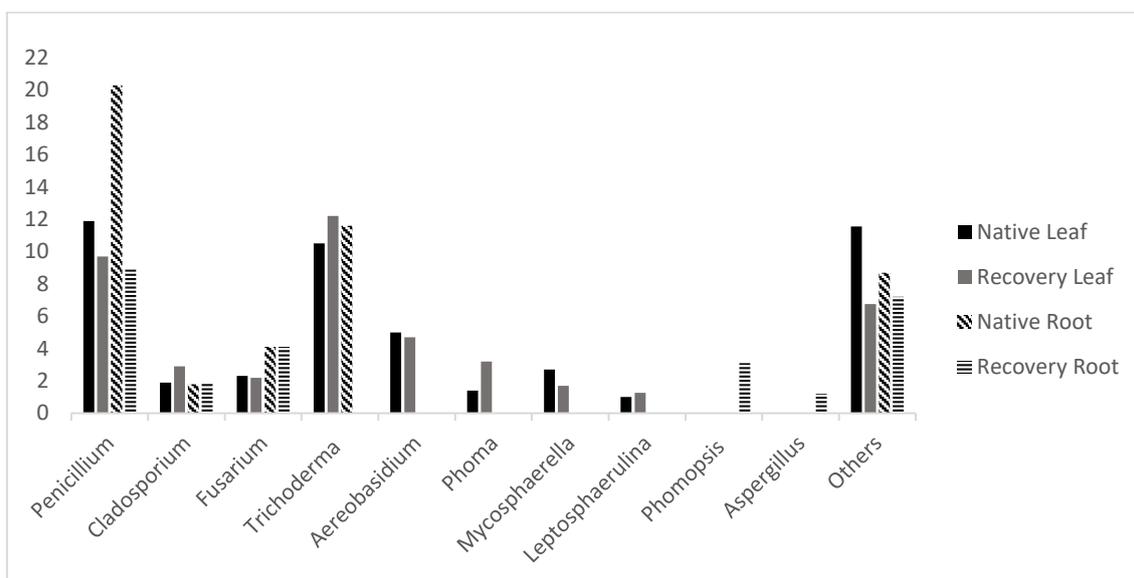


Fig. 5: Abundância Relativa (AR) dos gêneros de fungos endofíticos mais representativos associados à raízes e folhas de *A. grazielae* coletados nas áreas nativa e de recuperação. Fungos endofíticos com AR < 1% entre todas as amostras foram agrupados com “outros”.

Como pode ser observado na Figura 5, *Fusarium* (2,3 % e 2,2%), *Aureobasidium* (5,0% e 4,7%), *Leptosphaerulina* (1,0% e 1,3%) e *Mycosphaerella* (2,7% e 1,7%) mostraram uma composição muito similar em relação à AR das áreas nativa e de recuperação. *Phoma* (3,2%) e *Cladosporium* (2,9%) apresentaram a maior AR entre as amostras de folhas da RCA (Fig. 5).

Os demais gêneros com AR inferior a 1% nas raízes e folhas das duas áreas avaliadas estão nomeados na Figura 5 como “outros”, e descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Abundância Relativa (AR) dos gêneros de fungos associados com as raízes e folhas da NVA e RCA de *A. grazielae* (os táxons representados pelas respectivas sequencias relativas com ocorrência < 1%)

Gênero	Gêneros Dominante (%) (<1.0)			
	Folhas		Raízes	
	Nativa	Recuperação	Nativa	Recuperação
<i>Bartalinia</i>	0.04	0.28	0.00	0.00
<i>Khuskia</i>	0.36	0.08	0.00	0.00
<i>Trichoderma</i>	*	*	*	0.70
<i>Aereobasidium</i>	*	*	0.50	0.20
<i>Phoma</i>	*	*	0.70	0.80
<i>Mycosphaerella</i>	*	*	0.08	0.00
<i>Leptosphaerulina</i>	*	*	0.46	0.46
<i>Phomopsis</i>	0.86	0.60	0.10	*
<i>Aspergillus</i>	0.66	0.42	0.88	*
<i>Physconia</i>	0.16	0.20	0.00	0.00
<i>Nigrospora</i>	0.06	0.12	0.08	0.02
<i>Tritirachium</i>	0.06	0.02	0.00	0.00
<i>Preussia</i>	0.20	0.00	0.00	0.00
<i>Arthrobotrys</i>	0.08	0.12	0.28	0.06
<i>Caratobasidium</i>	0.00	0.00	0.90	0.00
<i>Gibberella</i>	0.04	0.10	0.00	0.00
<i>Neonectria</i>	0.08	0.10	0.00	0.00
<i>Doratomyces</i>	0.08	0.08	0.00	0.00
<i>Podospora</i>	0.02	0.08	0.00	0.00
<i>Cochiliobolus</i>	0.10	0.02	0.10	0.04
<i>Paraconiothyrium</i>	0.10	0.08	0.10	0.12
<i>Phaeosphaeria</i>	0.10	0.04	0.04	0.40
<i>Oudemansiella</i>	0.32	0.00	0.00	0.00
<i>Acaromyces</i>	0.16	0.06	0.00	0.00
<i>Cryptococcus</i>	0.12	0.14	0.16	0.08
<i>Panaeolus</i>	0.02	0.16	0.00	0.00
<i>Lacazia</i>	0.00	0.00	0.08	0.04
<i>Monographella</i>	0.00	0.00	0.10	0.02
<i>Pichia</i>	0.00	0.00	0.06	0.04
<i>Cercospora</i>	0.00	0.00	0.10	0.00
<i>Actinomucor</i>	0.08	0.08	0.14	0.30
<i>Stereocaulon</i>	0.64	0.16	0.00	0.00
<i>Bipolaris</i>	0.00	0.00	0.50	0.40
<i>Hypocrea</i>	0.14	0.14	0.12	0.00

<i>Acremonium</i>	0.20	0.10	0.20	0.10
<i>Candida</i>	0.06	0.14	0.12	0.18
<i>Lecanicillium</i>	0.12	0.14	0.14	0.14
<i>Pestalotiopsis</i>	0.98	0.08	0.00	0.08
<i>Chaeteomium</i>	0.16	0.20	0.80	0.50
<i>Rhizopus</i>	0.16	0.16	0.3	0.50
<i>Diaporthe</i>	0.02	0.08	0.00	0.90
<i>Scytalidium</i>	0.18	0.26	0.44	0.12
<i>Curvularia</i>	1.18	0.14	0.2	0.0
<i>Eurotium</i>	0.56	0.54	0.9	0.9
<i>Xanthoria</i>	0.94	0.60	0.00	0.00
<i>Toxicocladosporium</i>	1.34	0.12	0.00	0.00
<i>Passalora</i>	1.18	1.12	0.00	0.00
<i>Rhodotoruia</i>	0.00	0.00	0.10	0.08
<i>Bartalinia</i>	0.04	0.28	0.00	0.00
<i>Khuskia</i>	0.36	0.08	0.00	0.00
Total	11,56	6,76	8,7	7,2

*Fungos com ocorrência maior do que 1%.

Composição das comunidades de fungos nas raízes e folhas de A. grazielae

Foi realizada a Análise da Coordenada Principal (PCoA) baseada na matriz de β -diversidade de Bray-Curtis. Os resultados foram comparados com todas as amostras com o intuito de se detectar o grau de similaridade na composição da microbiota da NVA e da RCA de todas as cinco réplicas biológicas de cada amostra de PCoA (Fig. 6). A análise da β -diversidade mostrou que a estrutura total da RCA e NVA não diferiu entre os grupos (ANOSIM $p > 0.05$; Fig. 6). A composição da microbiota presente na RCA não foi diferente o suficiente para agrupar as amostras das áreas avaliadas. No entanto, houve um efeito significativo do tipo de amostra (raiz vs folha) na composição total da comunidade de fungos ($p < 0.002$; Fig. 6).

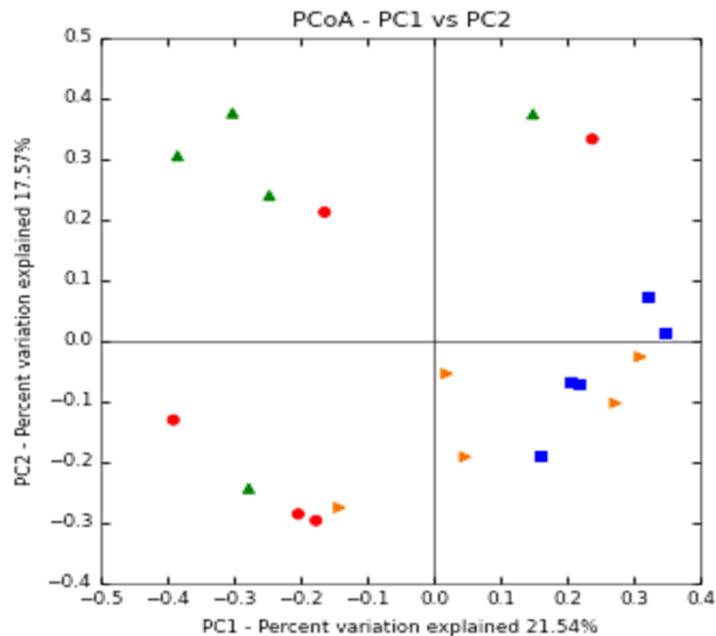


Fig. 6: Análise da Coordenada Principal (PCoA) baseada na matriz de β -diversidade de Bray-Curtis, descrevendo a estrutura da comunidade fúngica associada às raízes e folhas de *A. grazielae* em RCA e NVA. As comunidades endofíticas de cada área e de cada órgão de planta são indicadas por cores diferentes: círculos vermelhos = raízes da área nativa; triângulos verdes = raízes das áreas de recuperação; quadrados azuis = folhas das áreas nativas e triângulos laranja = folhas de área de recuperação.

Composição da comunidade endofítica de raízes e folhas de amostras A. grazielae coletadas na NVA e na RCA

A abundância relativa (AR) de todas as comunidades endofíticas de todas as amostras da NVA e RCA, só foram atribuídas para aquelas que apresentaram uma variação minimamente significativa ($p < 0.05$) (Fig. 7). A análise das amostras de raiz das duas áreas estudadas mostrou uma variação significativa na incidência do filo *Ascomycota*, o qual apresentou uma AR de 73% na NVA e de 33,5% na RCA (Fig. 7). Diferenças significativas também foram observadas na família Wallemiaceae do filo *Basidiomycota* originário da NVA e da família Amphispheariaceae do filo *Ascomycota* proveniente da RCA (Fig. 7).

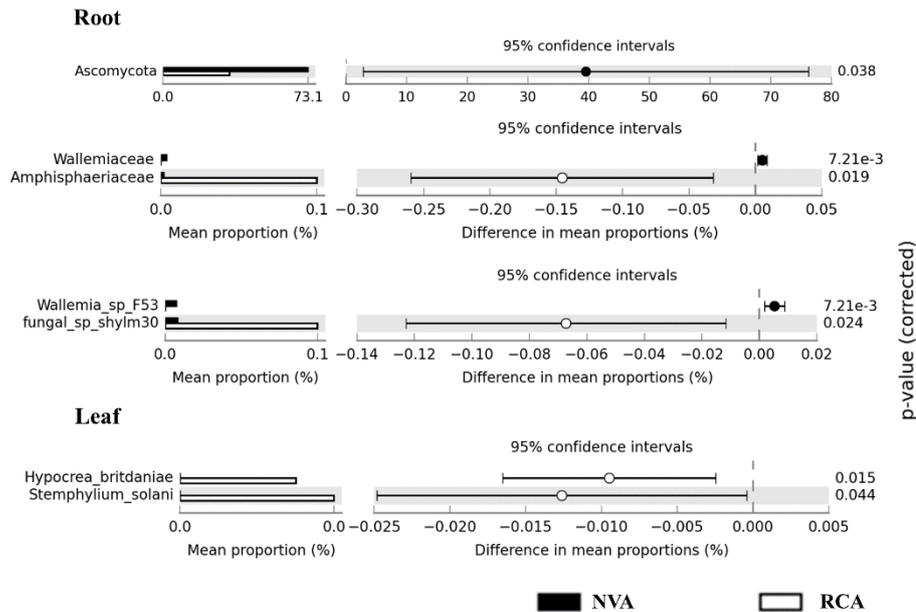


Fig. 7: Abundância Relativa (AR) das comunidades de fungos de amostras de raiz. As barras pretas representam a NVA e as barras brancas representam a RCA ($p < 0.05$ foi considerado significativo).

Duas espécies apresentaram diferenças significativas entre as amostras de raízes ($p < 0.05$). *Wallemia sp F53* foi encontrada somente na NVA, enquanto *Fungal_sp_shylm30* foi significativamente maior nas amostras da RCA.

Hypocrea britdaniae e *Stemphylium solani* foram as únicas espécies que apresentaram diferenças entre as amostras de folhas ($p \leq 0,05$), encontradas somente na RCA.

Discussão

Até o momento, somente 13 espécies vegetais da região do Pantanal tiveram suas comunidades de fungos endofíticos investigadas (Galvão et al. 2014; Gos et al. 2017; Parpinelli et al. 2017; Pietro-Souza et al. 2017; Noriler et al. 2018; Savi et al. 2018). Neste trabalho foi descrita, pela primeira vez, a diversidade das comunidades de fungos endofíticos de raízes e folhas de *A. grazielae*, considerando estudos envolvendo o Pantanal.

Os resultados mostrados neste trabalho estão de acordo com o padrão geral, que tem mostrado que a diversidade das comunidades endofíticas das raízes é maior do que dos tecidos foliares (Peay et al. 2016). Além disso, também foi observado que tanto as amostras da RCA proveniente das atividades de mineração como as da NVA apresentam associações robustas e específicas. Tais resultados sugerem a importância da conservação das NVAs no Pantanal para os metazoários (Junk et al. 2006; Alho 2008; Roque et al. 2016) e para as comunidades de fungos endofíticos.

Comunidades de fungos endofíticos de raízes e folhas

Os tecidos vegetais abrigam diferentes comunidades de fungos endofíticos nas regiões tropicais (Correia et al. 2017). Embora o número da taxa varie grandemente entre as diferentes espécies vegetais, alguns autores estimam que deve existir uma média de 30 fungos endofíticos por planta (Strobel and Daisy 2003; Tan and Zou 2001; Nisa et al. 2015). Em geral, os sistemas radiculares apresentam mais espécies associadas do as folhas e são dominados por diferentes espécies de fungos. Como esperado, foram detectadas as maiores OTUs nas raízes de *A. grazielae* (980,160 leituras) do que nas folhas (228,118 leituras). Uma provável explicação para este padrão é que os fungos associados às raízes são mais oportunistas; adicionalmente, várias espécies de fungos de solo também colonizam raízes de plantas (Akinsanya et al. 2015).

Foram identificadas 4.611 OTUs distintas das amostras de raízes e folhas nas duas áreas avaliadas, com 97% de similaridade. As OTUs foram distribuídas em 4 filos, incluindo *Ascomycota*, que foi mais comum nas amostras de raiz (53,3%) e nas amostras de folhas (63,3%). A dominância deste filo em muitas espécies vegetais parece ser uma característica geral da microbiota endofítica associada a plantas de

regiões tropicais (Gazis e Chaverri 2010; Barnes et al. 2016; Kivlin e Hawkes 2016; Khan et al. 2017; Zhao et al. 2018). Por outro lado, a despeito da baixa frequência, OTUs dos filos de *Zygomycota sensu lato* e *Basidiomycota* também foram encontrados nas amostras de *A. grazielae* de ambas as áreas. Wehner e colaboradores (2014) investigaram a comunidade de fungos associada às raízes de espécies da família Asteraceae e observaram que 18,3% das sequências estavam relacionadas ao filo *Basidiomycota* e 7,2% ao filo *Glomeromycota*. A relação entre a dominância de fungos e a espécie vegetal parece variar entre grupos taxonômicos, área de estudo e escala espacial. Entretanto, são necessárias maiores informações para qualquer generalização acerca dos fatores que determinam a dominância nestas comunidades.

Comunidades endofíticas das áreas nativa e em recuperação

A organização da microbiota na rizosfera é governada por fatores bióticos e abióticos (Lu et al. 2016; Tisthammer et al. 2016). Muitos estudos mostram que o solo tem grande influência na estruturação das comunidades de bactérias, fungos e micorrizas na rizosfera (Andrew et al. 2012; Inceoğlu et al. 2012). Características físico-químicas complexas do solo afetam a fisiologia vegetal, o padrão de exudação, os quais por sua vez, influenciam a composição da microbiota da rizosfera (Philippot et al. 2013; Aguilar-Trigueros and Rillig 2016; Peay et al. 2016).

Foi observado neste trabalho, que a dominância do filo *Ascomycota* nas raízes foi maior na NVA do que na RCA. Esta diferença na AR entre as duas áreas pode ser melhor entendida se considerarmos a organização da microbiota como resultante de uma hierarquia de eventos. O solo pode ser considerado um banco de sementes com suas propriedades físico-químicas e seus processos biogeográficos. Então a localização e as condições nas quais a planta cresce e são expostas, determina a biota

nativa de suas raízes. Espécies vegetais e seus genótipos determinam quais membros da reserva de microrganismos podem crescer e prosperar na rizosfera (Cox et al. 2010; Baldrian et al. 2012; Fujimura & Egger 2012).

As modificações antropogênicas causadas pelo extrativismo mineral podem ter contribuído para a mudança na composição das comunidades endofíticas das raízes entre as duas áreas, levando a uma seleção de gêneros que são melhor adaptados aos perfis específicos de cada solo. O gênero *Phomopsis* mostrou uma AR maior que 1% somente nas raízes da RCA, enquanto o gênero *Trichoderma* apresentou a menor AR nesta área em comparação com a NVA.

A variabilidade da composição das comunidades endofíticas de amostras de habitat limítrofes pode estar associada com as circunstâncias históricas das comunidades locais a partir de grupos regionais (Peay et al. 2016). Quando um recurso se torna disponível em um novo local, os primeiros táxons que colonizarem este local terão fortes vantagens competitivas, podendo excluir concorrentes tardios. Análises da RCA deste estudo focalizaram em áreas de recuperação onde a re-vegetação foi feita com plântulas de *A. grazielae* há dez anos atrás, em um solo previamente revolvido, do qual foi extraído minérios de ferro e manganês pela companhia mineradora. Provavelmente, havia maior disponibilidade de espécies de outros filos de fungos, melhor adaptados às novas condições abióticas, que foram selecionados pela planta hospedeira. Além disso, ao analisar a estrutura da comunidade de fungos endofíticos entre indivíduos de *A. grazielae*, observamos que houve maior AR entre amostras de folhas e raízes da RCA, com poucas OTUs compartilhadas entre as duas áreas. Em contraste com as comunidades endofíticas da NVA, onde os hospedeiros foram rapidamente estabilizados, os processos antropogênicos da mineração podem ter favorecido a colonização de novos

endófitos.

A abundância relativa dos gêneros de endofíticos nas folhas de *A. grazielae* em ambas as áreas não sofreu mudanças significativas. Entretanto, quando se analisa a AR dos gêneros presentes na raiz das duas áreas, observa-se uma mudança no perfil. Nas raízes da NVA, os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium* são predominantes, seguidos por *Fusarium*. Nas raízes das plantas da RCA, os gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Phomopsis* e outros não identificados são prevalentes. As diferenças na abundância relativa dos gêneros reforçam a ideia de que muitas espécies que vivem no solo podem colonizar plantas, resultando em notáveis diferenças.

Implicações dos resultados deste estudo no manejo e conservação

Este trabalho mostrou a alta diversidade da comunidade endofítica na RCA. Isto se deve, provavelmente, a um conjunto de fatores, tais como, alta resiliência dos fungos endofíticos à distúrbios ambientais, dinâmica entre fonte e propagação, maior disponibilidade de propágulos de fungos endofíticos presentes no solo como resultado do reflorestamento, a ausência de competição com outros hospedeiros (Terhonen et al. 2019).

Ao analisar a estrutura da comunidade de endofíticos de raízes da RCA de *A. grazielae*, detectou-se a formação de outras associações, sugerindo que muitas delas podem ser transientes no processo de adaptação. Esses resultados podem ser considerados como um “instantâneo” na linha do tempo das comunidades de fungos endofíticos das amostras de *A. grazielae* na RCA.

A. grazielae foi escolhida como a espécie ideal para reflorestamento após vários testes com outras espécies nativas. *A. grazeleae* foi a única apta a crescer em solo recém revolvido após extração de ferro pela companhia de mineração

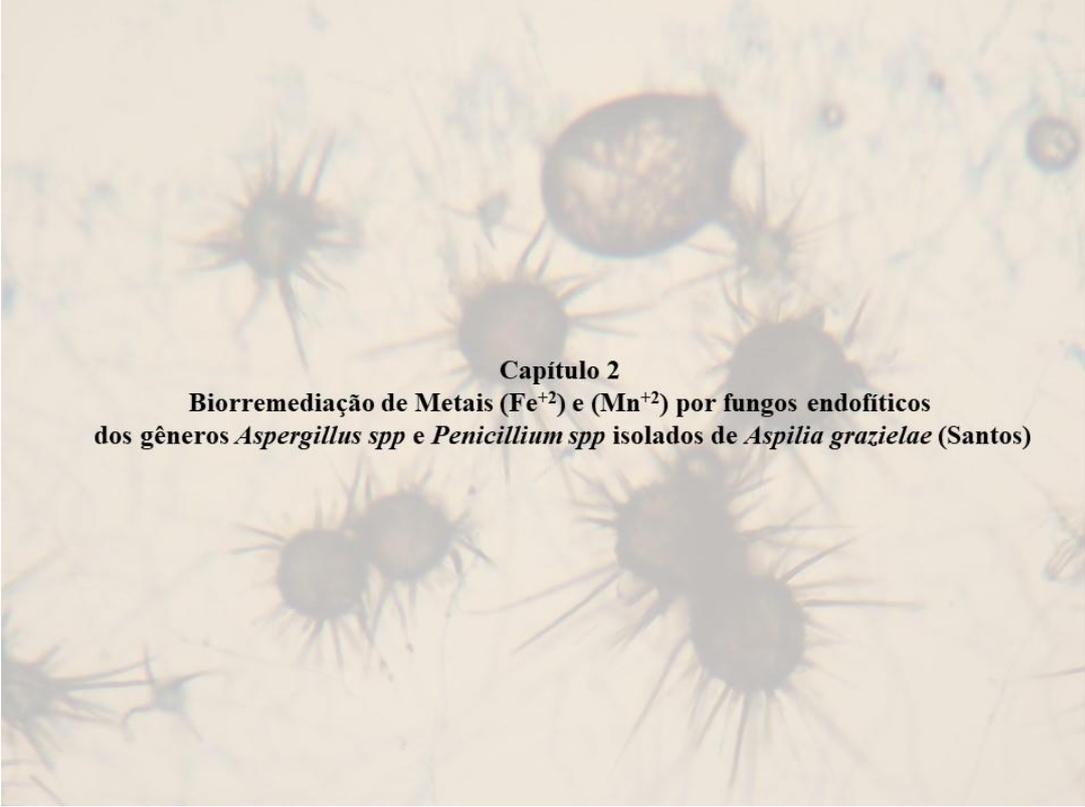
(Damasceno Júnior, informação pessoal). Curiosamente, o gênero *Trichoderma* está praticamente ausente nas raízes das amostras de *A. graziellae* da RCA, sendo eventualmente substituído por *Fusarium* e *Phomopsis* e outros não identificados. Estas mudanças ocasionais na estrutura da comunidade endofítica das raízes pode estar associada com as condições ambientais mencionadas previamente.

Na NVA existe um processo evolutivo antigo e complexo, envolvendo associações multitróficas. Deve ser o caso, por exemplo, da presença exclusiva do gênero *Wallemia* nesta área. Este gênero pertence à ordem Wallemiales (Wallemiomycotina, *Basidiomycota*), à qual pertencem as espécies mais xerotolerantes, xerofílicas e halofílicas conhecidas no mundo (Zajc & Gunde-Cimerman 2018).

Hipocrea britdaniae é uma espécie rara, descrita pela primeira vez na Europa, por Jaklitsch & Voglmayr (2012). No Brasil, esta espécie ainda não havia sido citada. Qin & Zhuang (2016) descreveram 4 novas espécies de *Trichoderma* na China Central, entre elas, *Trichoderma pseudobritdaniae* foi considerada ser muito semelhante à *Trichoderma britdaniae*.

A espécie *Stemphylium solani* (Weber) pode causar doenças foliares e foi descrita pela primeira vez em amostras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) coletadas na Flórida, EUA (Weber 1930). Pode ocorrer em todas as regiões onde o tomate é cultivado, afetando diferentes estágios de desenvolvimento. Outras espécies do gênero *Stemphylium* podem causar doenças em várias culturas agrícolas, tais como pera, mamão, algodão, alho, pimenta, alface e beringela (Farr & Rossman 2017). Observou-se uma redução significativa no filo *Ascomycota* na RCA revelando o grande impacto causado pelas atividades antropogênicas nesta comunidade endofítica.

A abordagem pioneira deste trabalho a esse sistema complexo e único é uma etapa para o reconhecimento da importância da preservação das áreas nativas do Pantanal. A região possui uma fonte substancial de comunidades endofíticas radiculares, que podem ser fundamentais para o sucesso de iniciativas de restauração de áreas antropizadas.



Capítulo 2
Biorremediação de Metais (Fe^{+2}) e (Mn^{+2}) por fungos endofíticos
dos gêneros *Aspergillus spp* e *Penicillium spp* isolados de *Aspilia grazielae* (Santos)

Gênero *Chaeteomium sp.* isolado das raízes de *Aspilia grazielae*

Biorremediação de Metais (Fe^{+2}) e (Mn^{+2}) por fungos endofíticos dos gêneros *Aspergillus spp* e *Penicillium spp* isolados de *Aspilia grazielae* (Santos)

Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de minérios. Metais pesados são constituintes naturais do ambiente, mas o uso indiscriminado tem alterado seus ciclos bioquímicos e geoquímicos. Apesar de gerar riqueza e crescimento econômico, está entre as atividades antrópicas que mais causam impactos ambientais negativos. É necessário reduzir a contaminação de metais de áreas degradadas, com tecnologias mais baratas e que causem menores impactos colaterais ao ambiente. A biorremediação é uma técnica que visa descontaminar solo e água por meio da utilização de organismos vivos, como microrganismos e plantas. As associações entre plantas e microrganismos têm recebido especial atenção devido ao potencial dos microrganismos em bioacumularem metais em ambientes poluídos. A espécie *Aspilia grazielae* (Santos L.) é endêmica da região das Morrarias do Urucum, em Corumbá, MS. Esta espécie é capaz de germinar e crescer em habitat com altas concentrações de ferro e manganês. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de biorremediação de Fe^{+2} e Mn^{+2} por fungos endofíticos dos gêneros *Aspergillus spp* e *Penicillium spp* isolados de *A. grazielae*. Foram coletadas amostras do material vegetal (folhas e raízes) de *A. grazielae*, em duas áreas distintas (mata nativa e de recuperação) na Morraria do Urucum. Os fungos endofíticos foram agrupados em morfotipos por características micromorfológicas (estruturas de reprodução) e macromorfológicas (e.g. cor, estrutura da colônia e velocidade de crescimento). Os espécimes foram submetidos a um teste de resistência nas concentrações 300mg/L e 1000 mg/L de ferro, as mesmas concentrações de manganês e ferro/manganês combinados. Em seguida, os isolados com os melhores resultados foram selecionados para o teste de biorremediação em meio de cultura líquido contendo 10 mg/L Fe^{+2} e Mn^{+2} . Na área nativa foram encontrados 29 e 32 morfotipos dos gêneros *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*, respectivamente. Já na área de recuperação foram encontrados 38 e 8 morfotipos do gênero *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*, respectivamente, mostrando que houve um declínio da biodiversidade destes gêneros na área degradada. No teste de resistência, os isolados de *Penicillium spp* que apresentaram melhores resultados no tratamento com Fe^{+2} foram BR4, DF9B, CR1, BR10 provenientes da área nativa e PR5 e RR3(1) provenientes da área de recuperação. Os isolados de *Aspergillus spp*: EF13, DF11 provenientes da área nativa e LF12, TR3(1) e PR2 provenientes da área de recuperação foram os mais resistentes ao ferro. O tratamento com Mn^{+2} não causou toxicidade e ainda estimulou o crescimento dos isolados OR3 e BR10. Com os metais combinados, verificou-se que os melhores resultados foram dos isolados RR3(1), CR1, LF12, EF13 e PR2, que foram selecionados para o teste de biorremediação. Os isolados CR1 e RR3(1) apresentaram os melhores resultados de crescimento em meio líquido na presença de metais, superando os controles, e também foram os mais

eficientes na absorção dos metais presentes no meio de cultura indicando que estes apresentam um alto potencial para biorremediação.

Palavras-chave: *Aspilia graziellae*; microrganismos endofíticos; remoção de metais

Abstract

Brazil is one of the world's largest ore producers. Heavy metals are natural constituents of the environment, but indiscriminate use has altered their biochemical and geochemical cycles. Despite generating wealth and economic growth, it is among the human activities that most cause negative environmental impacts. It is necessary to reduce the contamination of metals from degraded areas, with cheaper technologies that cause lesser collateral impacts to the environment. Bioremediation is a technique that aims to decontaminate soil and water through the use of living organisms, such as microorganisms and plants. The associations between plants and microorganisms have received special attention due to the potential of microorganisms to bioaccumulate metals in polluted environments. The species *Aspilia grazielae* (Santos L.) is endemic to the region of Morrarias do Urucum, in Corumbá, MS. This species is capable of germinating and growing in a habitat with high concentrations of iron and manganese. Thus, the objective of this work was to evaluate the bioremediation capacity of Fe^{+2} and Mn^{+2} by endophytic fungi of the genera *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp isolated from *A. grazielae*. Samples of plant material (leaves and roots) of *A. grazielae* were collected in two different areas (native and recovery forest) in Morraria do Urucum. Endophytic fungi were grouped into morphotypes by micromorphological (reproductive structures) and macromorphological (e.g. color, colony structure and growth rate) characteristics. The specimens were subjected to a resistance test at concentrations of 300mg / L and 1000mg / L of iron, the same concentrations of manganese and iron / manganese combined. Then, the isolates with the best results were selected for the bioremediation test in liquid culture medium containing 10 mg/L of Fe^{+2} and Mn^{+2} . In native area, it was found 29 and 32 morphotypes of genus *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp, respectively. In the recovery area, it was found 38 and 8 morphotypes of the genus *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp, respectively, showing that there was a decline in the biodiversity of these genera in the degraded area. In the resistance test, the isolates of *Penicillium* spp that showed better results in the treatment with Fe^{+2} were BR4, DF9B, CR1, BR10 from the native area and PR5 and RR3 (1) from the recovery area. The isolates of *Aspergillus* spp: EF13, DF11 from the native area and LF12, TR3 (1) and PR2 from the recovery area were the most resistant to iron. Treatment with Mn^{+2} did not cause toxicity and also stimulated the growth of isolates OR3 and BR10. With the combined metals, it was found that the best results were from isolates RR3 (1), CR1, LF12, EF13 and PR2, which were selected for the bioremediation test. The isolates CR1 and RR3 (1) showed the best results of growth in liquid medium in the presence of metals, surpassing the controls, and were also the most efficient in the absorption of metals present in the culture medium, indicating that they have a high potential for bioremediation.

Keywords: *Aspilia grazielae*; endophytic microorganisms; metal removal

Introdução

Mineração no Brasil

A exploração mineral em Mato Grosso do Sul ganhou relevância na segunda metade da década de 90, quando a empresa, então denominada Companhia Vale do Rio Doce, se tornou a única proprietária da Urucum Mineração S/A Lamoso (2015). As jazidas sul-mato-grossenses estão situadas nos municípios de Corumbá e Ladário, próximas à linha internacional da fronteira Brasil-Bolívia, compondo a formação da serra do Rabicho, Morro Grande, Serra de Santa Cruz, Morro de Tromba dos Macacos, Serra do Jacadigo e do Morro do Urucum. Na topografia da planície do rio Paraguai, destacam-se essas formações, que são popularmente conhecidas como “Morraria do Urucum” Lamoso (2001).

Ferro e Manganês

O minério de ferro representa uma importante parcela da economia mundial e nacional, principalmente como matéria-prima para o aço, que é largamente utilizado em diversos setores (Gomes 2013), e produção de muitos itens, entre os quais se destacam automóveis, máquinas e equipamentos. Mato Grosso do Sul, ocupa o terceiro lugar na produção destes minérios e sua jazida está localizada nos municípios de Corumbá e Ladário na região do Pantanal Sul-Mato-Grossense, na fronteira com a Bolívia.

A presença de ferro no solo em altas concentrações também pode formar placas de ferro nas raízes das plantas, formando uma barreira contra o próprio ferro (Snowden & Wheeler 1995; Tripathi et al. 2014), mas também inibe a absorção de outros nutrientes ao danificar a epiderme das raízes (Jorgenson et al. 2013). A sua deposição afeta direta ou indiretamente as plantas, bloqueando os estômatos e

diminuindo a área fotossintética (Naidoo & Chirkoot 2004). Assim, os mecanismos de absorção e translocação também são afetados diretamente.

O minério de manganês é um recurso natural importante na produção de ferroligas e aço (Costa & Figueiredo 2001). Como constituinte do solo, ocorre em compostos de manganês, combinados com outros elementos como oxigênio, enxofre, carbono, silício e cloro (Pinsino et al. 2012). As principais fontes antropogênicas deste metal estão relacionadas as descargas municipais de águas residuais, lodo de esgoto, na mineração e na emissão de aditivos para combustão (Howe; Malcolm; Dobson, 2005).

Os níveis de manganês nas plantas podem variar entre 5 e 1500 mg kg⁻¹ na matéria seca, dependendo da espécie e da parte a ser analisada. Os valores considerados adequados para um crescimento e desenvolvimento normal estão entre 20 e 500 mg kg⁻¹, sendo que abaixo disso podem causar deficiência e acima, toxicidade (Dechen & Nachtigall 2006; Marschner, 2012). O manganês está altamente correlacionado com processos fisiológicos que melhoram a resistência das plantas a doenças porque participa da composição de várias enzimas como ativador ou cofator (Zanão Júnior et al. 2019). No entanto, altos níveis de Mn podem causar toxicidade às plantas (Santos et al. 2017), apresentando danos como necrose e encarquilhamento nas ponta e bordas das folhas, perda de coloração verde e redução do crescimento Rufino (2006). De acordo com Santos et al. (2017), a toxicidade do Mn diminui a taxa fotossintética, reduzido o crescimento vegetal. Xue et al. (2004) relataram sintomas de toxidez quando a concentração de Mn estava acima de 8000 µmol L⁻¹. Em algumas variedades de gramíneas forrageiras são observados sintomas de toxidez na faixa entre 60 e 217 mg.dm⁻³ Nardis (2012).

Recuperação de áreas degradadas

Apesar de gerar riqueza e crescimento econômico, a indústria extrativa mineral está entre as atividades antrópicas que mais causam impactos socioeconômicos e ambientais negativos, nos locais onde se realiza a mineração (Araujo et al. 2014; Pereira et al. 2017).

A recuperação de uma área consiste no processo de reparação dos recursos nos locais perturbados, restabelecendo algumas funções no solo, dentre elas a ciclagem de nutrientes, aumento de diversidade e das espécies naturais da região bem como das atividades biológicas (Quintela-Sabarís et al. 2019). A mineração implica na supressão da vegetação e na qualidade da água, que acaba contaminada por substâncias carregadas nos efluentes das áreas de mineração, podendo atingir as águas subterrâneas (Mechi; Sanches, 2010). A contaminação da água é uma das mais preocupantes por ser um insumo indispensável não só aos organismos vivos, mas também à produção e ao desenvolvimento social e econômico (Melo, 2016; Santos, Cezar, Bonadio, 2016).

Quando se trata de contaminação por metais em áreas degradadas, alguns dos processos de remoção podem apresentar um custo final elevado e/ou causar a liberação de novos contaminantes. Assim surge necessidade de buscar novas tecnologias para a remoção destes metais, mais baratas e que causem menores impactos colaterais ao ambiente (Lemos & Santos 2007; Zaghoul & Saber 2019).

Fitorremediação

Muitos estudos foram e ainda são desenvolvidos na busca do controle da contaminação por metais em áreas de extração de minerais. Uma delas é a biorremediação que, segundo Pires et al. (2003), é a técnica que visa descontaminar

solo e água por meio da utilização de organismos vivos, como microrganismos e plantas.

Dentro da biorremediação insere-se a fitorremediação, que, segundo Accioly & Siqueira (2000), envolve o emprego de plantas, sua microbiota associada e de amenizantes (corretivos, fertilizantes, matéria orgânica etc.) do solo, além de práticas agronômicas que, se aplicadas em conjunto, removem, imobilizam ou tornam os contaminantes inofensivos ao ecossistema.

Nos últimos anos, o uso de plantas e seus microrganismos para descontaminação de solo e água tornou-se uma ferramenta importante nos processos de remoção de uma quantidade enorme de poluentes orgânicos e inorgânicos como sais, metais, pesticidas e hidrocarbonetos de petróleo, e às vezes, vários deles simultaneamente (Pio et al. 2013; Bisht et al. 2015).

Biorremediação por microrganismos endofíticos

As associações entre microrganismos e plantas são extremamente comuns na natureza. Segundo Chapla et al. (2013) endofíticos são quaisquer microrganismos que residem no interior de plantas, na região definida como endosfera, de modo geral, e em suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros. Sendo assim, é estabelecida uma relação simbiótica entre a planta e o microrganismo. A planta hospedeira abriga e fornece nutrientes para o desenvolvimento do simbiote, que por sua vez ajuda na proteção contra herbívoros e patógenos da planta; bem como na sua adaptação aos fatores bióticos e abióticos (Linnakoski et al. 2011).

As associações entre plantas e microrganismos metatolerantes tem recebido especial atenção devido ao potencial dos microrganismos em bioacumularem metais

em ambientes poluídos, bem como seus efeitos sobre a mobilização/imobilização de metais. Por consequência, esta associação aumenta a absorção de metais e o crescimento das plantas, sendo que o uso sinérgico de plantas e microrganismos é favorável para a descontaminação de solos metálicos (Jingy et al. 2007; Glick 2010; Ma 2011; Igiri et al. 2018). Os microrganismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo, na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes (Oliveira & França 2005; Soares et al. 2011).

Mesmo que o microrganismo não tenha capacidade de tolerar o metal pesado, sua relação com a espécie vegetal permite à planta bioacumuladora/tolerante melhorar seu desenvolvimento no ambiente contaminado (Ojuederie & Babalola 2017).

A remoção dos metais pode ser feita por atividade metabólica ou por mecanismos físicos-químicos. A biossorção é um processo que ocorre, quando os metais se acumulam na superfície celular, sem haver gasto energético e a bioacumulação ocorre, quando há atividade metabólica do microorganismo para acumular os metais (Blumer 2002; Zabochnicka-Świątek et al. 2014; Igiri et al. 2018).

O uso de fungos filamentosos tem se destacado em relação aos outros microrganismos na remoção de metais do ambiente, pois eles apresentam maior resistência a metais tóxicos, o que proporciona seu crescimento e desenvolvimento em meios que contenham altas concentrações desses poluentes (Collins 1992; Oladipo et al. 2018).

Espécie Aspilia grazielae (Santos) (Asteraceae)

A Família Asteraceae possui distribuição cosmopolita, sendo a maior família das Eudicotiledôneas, com aproximadamente 1600 gêneros e 23 mil espécies, sendo 300 gêneros e 2 mil espécies ocorrentes no Brasil. São particularmente comuns em formações abertas do Brasil, onde se destacam espécies de *Calea* e *Aspilia* (Souza e Lorenzi 2008).

A espécie *Aspilia grazielae* Santos é endêmica das Morrarias do Urucum, Corumbá, MS. Esta região é considerada uma grande jazida de ferro e manganês. Foi observado que embora esta espécie tenha ocorrência esparsa nas áreas de mata preservadas, ela consegue germinar em condições consideradas altamente estressantes para a maioria das espécies vegetais (Santos 1987).

Logo após a extração do ferro e do manganês, as empresas mineradoras devolvem a camada de solo que foi retirada ao mesmo local. No entanto, a concentração destes metais nestas áreas ainda é muito alta.

A. grazielae é uma das poucas espécies capazes de germinar e crescer nestas condições, o que nos leva a acreditar que existem mecanismos de adaptação ou evitação às altas concentrações de ferro e manganês. Plantas com essas habilidades são hiperacumuladoras e altamente especializadas em acumular ou tolerar altíssimas concentrações de metais (Raskin et al. 1994). No entanto, não encontramos informações desta natureza na literatura para a espécie *A. grazielae*. Os estudos sobre esta espécie estão limitados apenas a listas de verificação e ao seu endemismo (Pott et al. 2000; Santos 2001; Farinaccio et al. 2018). Além disso, *A. grazielae* já foi incluída no livro vermelho de espécies de plantas em risco de extinção (Brasil 2014; Roque et al. 2018). No entanto, esta espécie tem sido utilizada pela Vale S.A. na

recuperação de áreas degradadas, pois suporta solos com altas concentrações de metais.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar tolerância e a capacidade de biorremediação de Fe^{+2} e Mn^{+2} de cepas de fungos endofíticos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de folhas e raízes de *A. graziellae* (Santos L.) coletadas de duas áreas distintas no Morro do Urucum (Corumbá – MS): uma área nativa, não desmatada, e uma área de recuperação.

Material e Métodos

Local e processamento da coleta

As coletas foram realizadas nos meses de outubro de 2015 e março de 2016, na morraria do Maciço do Urucum, município de Corumbá-MS (19° 00' 33" S 57° 39' 12" W). O Maciço do Urucum, juntamente com os morros calcários de Corumbá, é uma das formações de morros residuais situadas ao longo da fronteira com a Bolívia, a oeste do rio Paraguai com altitude máxima de 1.060 m, constituindo o ponto mais alto do Mato Grosso do Sul (MS), com uma área de 1.311 km² (Silva et al. 2000).

A vegetação presente no Maciço do Urucum varia desde floresta estacional semidecídua (a cerca de 100 m de altitude) a campo de altitude (topo dos morros na cota de 1000 m de altitude), além de floresta estacional decidual nas áreas calcárias (Tomas et al. 2010), matas ciliares inundáveis do rio Paraguai, matas inundáveis associadas às baías Negra e do Arroz e as formações de vegetação aquática (Bortolotto et al. 1999; Pott et al. 2000).

Foram coletados 20 indivíduos de *A. graziella*, separados em folhas e raízes, totalizando 40 amostras de duas áreas distintas (mata nativa e de recuperação) (Figuras 01a e 1b), para cultivo e isolamento das espécies fúngicas endofíticas.

A mineradora Vale S.A. utiliza a região do Morro do Urucum para a extração de minério de ferro e manganês. As áreas que apresentam suas características fitofisionômicas alteradas, devido aos processos de extração de minério, foram denominadas de área de recuperação. As áreas de mata nativa, são as regiões que não sofreram processos de extrativismo, com isso suas características naturais ainda permanecem inalteradas.

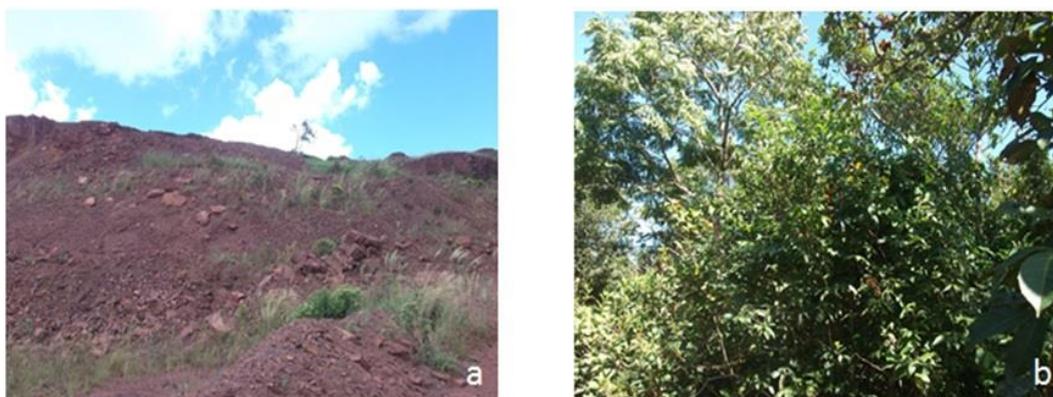


Figura 01. Locais das coletas de *A. grazielae* localizadas na área de recuperação (a) e área nativa (b)

O material recém-coletado foi acondicionado em sacos plásticos previamente identificados e armazenados em caixas térmicas com gelo e transportados ao Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, onde recebeu tratamento adequado para o isolamento dos fungos endofíticos. Um exemplar foi depositado no herbário da UFMS com número de voucher CGMS 59308.

Isolamento dos fungos endofíticos

Todo o material utilizado no isolamento foi previamente esterilizado em autoclave. O isolamento dos fungos filamentosos endofíticos foi realizado como descrito por Petrini (1986) e adaptado por Glienke-Blanco et al. (2002). Folhas e raízes foram lavadas com água corrente e em seguida submetidas a submersões

consecutivas na seguinte sequência: detergente a 10% por 10 min (v/v), água destilada estéril por 3 min, hipoclorito de sódio (NaClO) a 10% (v/v) por 10 min, água destilada estéril por 3 min, álcool etílico 70% (v/v) por 3 min, e 3 lavagens consecutivas em água destilada estéril.

Fragmentos de 1 x 1 cm de folhas e de 1,0 cm de raízes foram obtidos com o auxílio de bisturi e pinça em placas de vidro, em capela de fluxo laminar. Dez fragmentos de folhas e dez fragmentos de raízes foram inoculados, separadamente, em placas de Petri previamente preparadas contendo meio Dextrose Agar Batata (BDA) (acrescido de tetraciclina (100 µg/mL) para impedir crescimento bacteriano) em pH 6,8. Foi preparado um controle, através da inoculação da água estéril utilizada na última lavagem do material vegetal em placa de Petri, a fim de certificar a inexistência de qualquer outro microrganismo que não seja endofítico (Figura 2).

As placas foram incubadas durante 20 dias, com monitoramento de 24 horas (temperatura $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Após o surgimento das colônias, foi realizado o isolamento e as colônias transferidas para novas placas até obtenção de colônias puras.

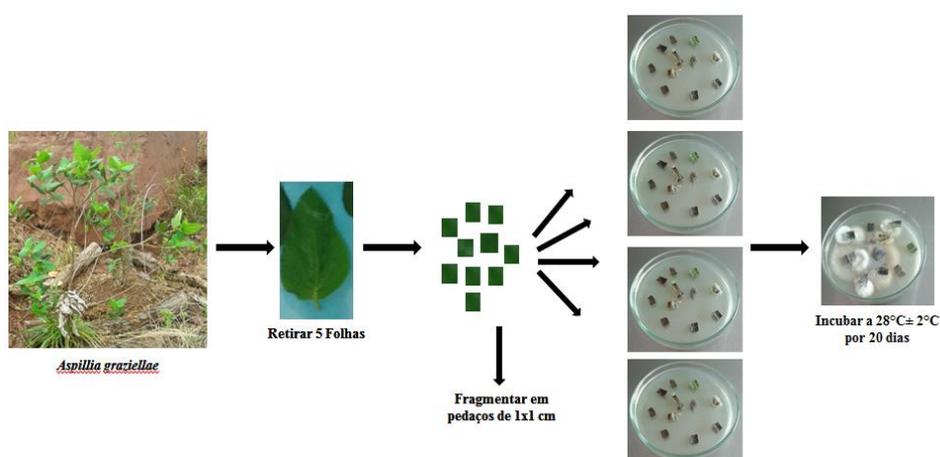


Figura 02. Isolamento dos fungos endofíticos

Agrupamento por morfoespécie

As colônias obtidas foram agrupadas em morfotipos por características micromorfológicas (estruturas de reprodução) por meio da técnica de microcultivo e macromorfológicas (*e.g.* cor, estrutura da colônia e velocidade de crescimento) (Ellis, 1971; Sutton, 1980; Domsch et al., 1993; Weir et al., 2012). Em seguida, foram incubadas em meio BDA, a 28°C e observadas por 7, 14 e 21 dias (Brunelli et al. 2006). As lâminas foram coradas com lactofenol azul de algodão e visualizadas em microscópio óptico. Os caracteres morfológicos, quando possível, foram comparados em chaves taxonômicas (Griffin 1993; Watanabe 2002), e posteriormente documentadas por fotomicroscópio através do software ImageTool v.3 (Wilcox et al. 2002).

Os isolados foram identificados da seguinte forma:

- 1ª letra representa a qual área pertence – Os isolados da Área nativa foram identificados com as letras A, B, C, D, E, F, G, H, I e J. Os da área de recuperação com as letras K, L, M, N, O, P, Q, R, S e T.
- 2ª letra representa a qual parte da planta representa – Folha = F; Raiz = R.
- Números representam a sequência de fungo encontrada na planta.

Exemplo: isolado BR11 - foi isolado da área nativa, de raízes e foi o número 11 na sequência de isolamento.

- Letras após números ou números entre parênteses significam que o isolado foi encontrado mais de uma vez.

Exemplo: AF12A e AF12B ou KR4(1) e KR4(2).

Testes de resistência a ferro (Fe^{+2}) e manganês (Mn^{+2}) em meio sólido

Foram cultivados 20 morfoespécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e 15 morfoespécies do gênero *Penicillium* e avaliados quanto a resistência aos metais, em tratamentos com meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Ferro e Manganês. Os metais foram adicionados na forma de sais. O ferro na forma de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Fe^{+2}) e o manganês na forma de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Mn^{+2}). As concentrações utilizadas foram:

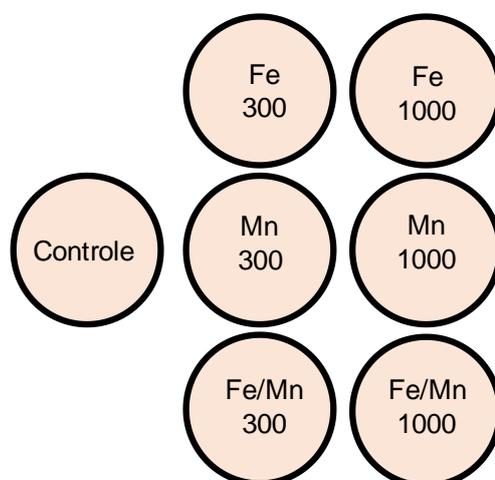


Figura 03. Tratamentos realizados no teste de resistência: 300 mg/L de Ferro; 1000 mg/L de Ferro; 300 mg/L de Manganês; 1000 mg/L de Manganês; 300 mg/L de Ferro + 300 mg/L de Manganês e 1000 mg/L de Ferro + 1000 mg/L de Manganês. O controle foi o Meio BDA na ausência de metais.

Após a inoculação dos fungos, as placas foram mantidas em estufa BOD, a 28°C por 4 dias. A cada 24 h, o diâmetro das colônias foi medido, com o auxílio de um paquímetro (Neiroti e Azevedo, 1988). Os fungos que apresentaram os melhores resultados foram selecionados para os testes de biorremediação em meio de cultura líquido.

Teste de biorremediação de ferro (Fe^{+2}) e manganês (Mn^{+2}) em meio de cultura

líquido

Foram preparados Erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultura líquido

(Batata Dextrose - BD), os quais foram classificados como: Padrão (meio BD + metal) utilizado para determinação da concentração inicial dos metais; Branco (meio BD + fungo) para determinação do crescimento micelial; Tratamentos (meio BD + metal + fungo) para determinação do percentual de remoção de metal (Fig. 05). Nos frascos com metal, foram acrescidos de 0,05g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,03g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para se obter a concentração final de 10 mg de Fe e 10 mg de Mn por 100 mL de meio.

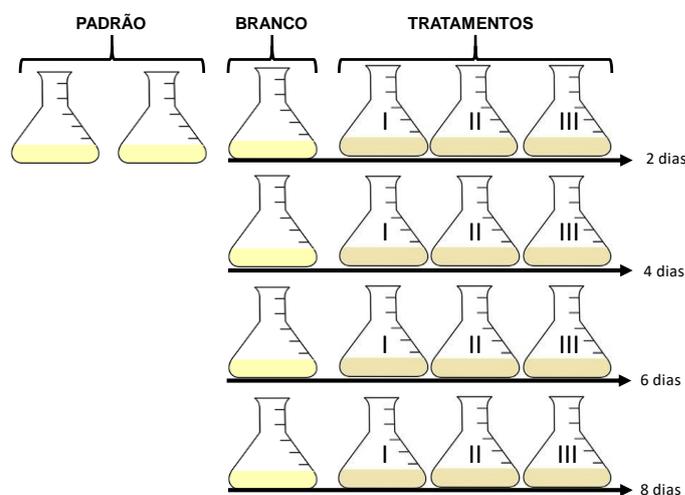


Figura 04. Ilustração do teste de biorremediação

Neste experimento foram utilizados os isolados que apresentaram os melhores resultados após o teste em meio sólido (descrito no item 3.4).

Foi preparada uma suspensão de esporos de cada isolado selecionado, com água destilada estéril contendo Tween 80 na proporção de 0,5% (m/v). A concentração de esporos de cada suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1 mL de cada suspensão contendo 10^6 esporos foi inoculado em cada um dos frascos correspondentes contendo o meio de cultura batata-dextrose.

O experimento foi realizado em triplicata, por um período de oito dias. A cada

dois dias, o meio foi filtrado a vácuo para remoção dos micélios da fase aquosa. Este procedimento foi repetido para os brancos e padrões. O papel de filtro contendo a massa micelial foi acondicionado em placas de Petri e incubados em estufa a 40° C para secagem até peso constante, para determinação do peso seco dos micélios (adaptado de SILVA 2007).

As soluções resultantes de meio de cultura foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica por chama para determinação da concentração dos Fe e Mn no Laboratório de Análises de Água (LAQUA) da Faculdade de Engenharia e Geografia (FAENG) da UFMS (adaptado de SILVA 2007).

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste F. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, comparando o controle entre os tratamentos com nível de $p < 0.05$, utilizando o programa Graph Pad Prism 8 na análise dos dados.

Resultados

Abundância relativa das morfoespécies de *Aspergillus* e *Penicillium*

Tabela 1. Abundância relativa dos espécimes de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de *Aspilia graziellae* na área nativa e de recuperação

Gêneros		Indivíduos <i>A. graziellae</i>																				Total
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		
		Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	
Plantas área nativa	<i>Aspergillus</i> sp	1	2	2	1	0	4	2	1	4	1	2	0	2	0	3	0	1	1	1	0	28
	<i>Emicela</i> sp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	<i>Penicillium</i> sp	4	2	2	6	0	7	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	32
	Total	5	4	4	7	0	11	6	7	4	1	2	0	2	1	3	0	1	2	1	0	61
Plantas área Recuperação	<i>Aspergillus</i> sp	2	5	6	0	10	0	0	0	1	0	2	5	1	0	1	2	0	0	0	3	38
<i>Penicillium</i> sp	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0	8
Total	2	6	6	0	10	0	0	1	1	1	2	7	1	1	1	4	0	0	0	3	46	

A Tabela 1 mostra a abundância relativa de espécimes dos gêneros *Aspergillus*

e *Penicillium* nas duas áreas estudadas. Foram encontrados 107 espécimes nas duas áreas, incluindo *Emericella* que corresponde à fase sexuada de *Aspergillus* (Pitt et al, 2014). Na área nativa foram encontrados 61 morfoespécies, sendo 29 do gênero *Aspergillus* e 32 do gênero *Penicillium* e na área de recuperação 46 morfoespécies, dos quais 38 pertencem ao gênero *Aspergillus* e 8 ao gênero *Penicillium*.

Analisando os resultados obtidos, observamos que o gênero *Penicillium* apresentou uma abundância relativa três vezes maior na área nativa, indicando que este grupo foi mais afetado pelos impactos causados pelo processo antropogênico da mineração. De maneira inversa a este processo o gênero *Aspergillus* teve um aumento da abundância relativa na área de recuperação.

Testes de Resistência a Ferro (Fe^{+2}) e Manganês (Mn^{+2}) em Meio Sólido

Como mostra a Figura 5A, o meio contendo Fe^{+2} nas duas concentrações foi tóxico para os isolados de *Penicillium spp* NR8, BR11, AF15, PR8, IR6, RR3₍₂₎ e OR3. No entanto não afetou ou afetou muito pouco o crescimento dos isolados BR4, PR5, DF9B e RR3₍₁₎. Já os isolados DR4B, CR6A, BR10 e CR1 tiveram seu crescimento estimulado pela presença de ferro no meio de cultura nas duas concentrações.

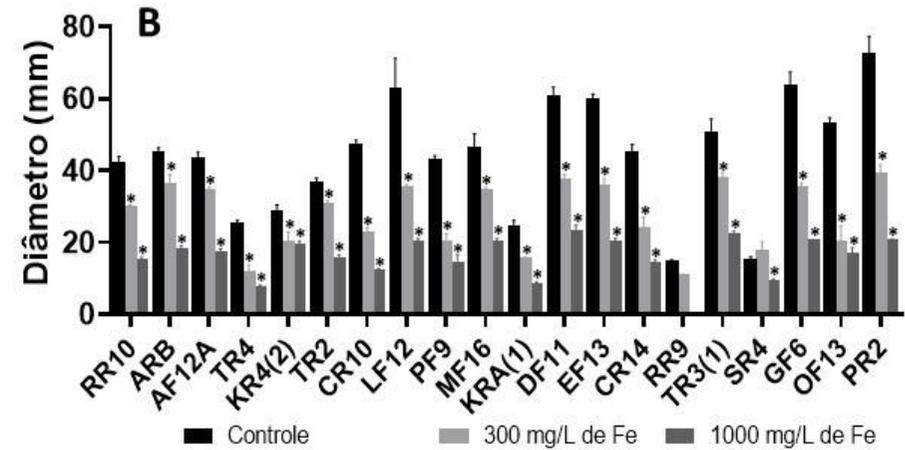
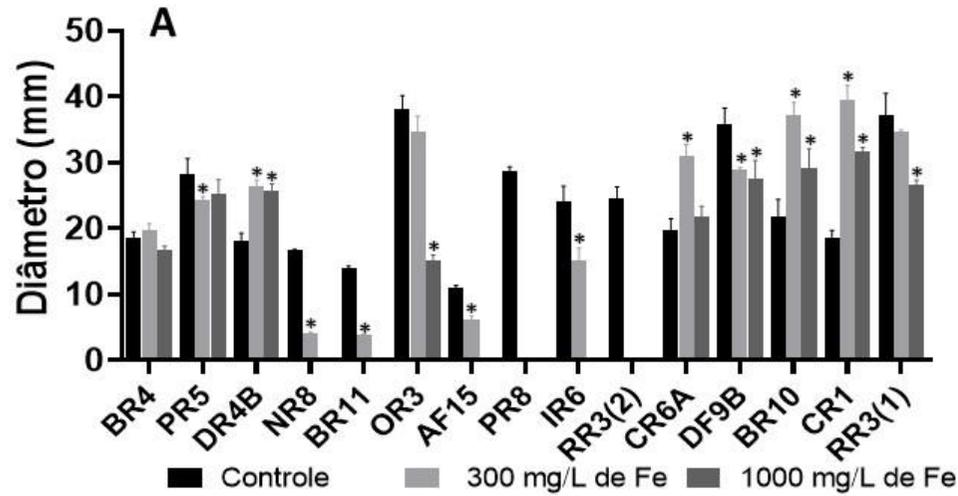


Figura 05. Crescimento dos espécimes de *Penicilium* (A) e *Aspergillus* (B) em diferentes concentrações de Fe^{+2} . Os asteriscos (*) correspondem às médias dos tratamentos que diferiram das médias do controle.

Estes resultados mostram que a comunidade endofítica de *A. grazielae* responde diferentemente a este estresse específico (altas concentrações de ferro). No entanto, estudos *in vitro* são muito diferentes da dinâmica das comunidades *in vivo*, e é provável que as respostas na planta sejam muito diversas destas que obtivemos nestes experimentos. Os isolados BR4, PR5, DR4B, DF9B, CR1, BR10 e RR3₍₁₎ são bons candidatos para processos de biorremediação de áreas poluídas com excesso de ferro. Vale ressaltar também, que a maioria dos isolados com alta resistência à altas concentrações de ferro são da área nativa, com exceção dos isolado PR5 e RR3₍₁₎, o que sugere uma adaptação evolutiva das mesmas às condições locais do habitat onde a espécie vegetal se encontra.

A Figura 5B mostra os resultados obtidos nos testes de resistência ao ferro dos isolados de *Aspergillus* de *A. grazielae*. Observa-se que todas os espécimes testados cresceram nas duas concentrações, demonstrando preferência pelo ferro em todas as concentrações.

Os isolados que apresentaram melhor crescimento foram LF12, EF13, DF11, TR3₍₁₎ e PR2. No caso do gênero *Aspergillus* notou-se que também houve um maior número de isolados da área nativa mais adaptados em relação à área de recuperação.

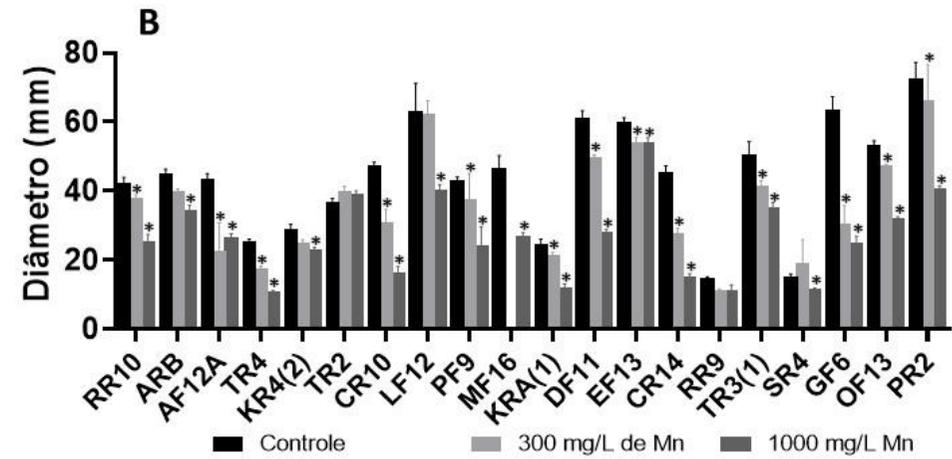
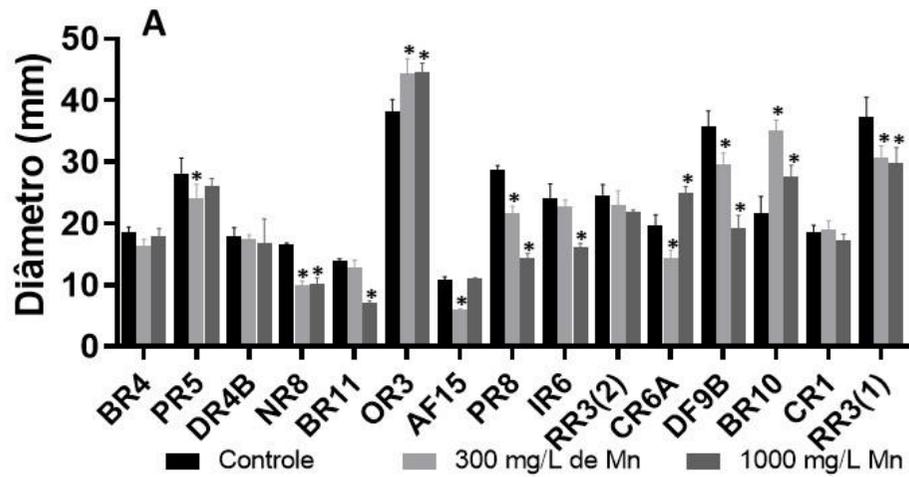


Figura 06. Crescimento dos espécimes de *Penicilium* (A) e *Aspergillus* (B) em diferentes concentrações de Mn^{+2} . Os asteriscos (*) correspondem às médias dos tratamentos que diferiram das médias do controle.

A Figura 6A mostra os resultados obtidos dos testes com diferentes concentrações de manganês sobre os isolados de *Penicillium*. Observa-se que este metal não causou toxicidade aguda em nenhum dos isolados testados e não afetou ou afetou muito pouco o crescimento dos mesmos. Por outro lado, os isolados OR3 e BR10 tiveram seu crescimento estimulado pela presença de manganês no meio de cultura.

Como pode ser observado na Figura 6B, o manganês não causou toxicidade aparente sobre os isolados de *Aspergillus* testados. Por outro lado, também não foi um promotor de crescimento, como foi observado em alguns isolados de *Penicillium spp* (Figura 6A). Os isolados que apresentaram melhor crescimento foram ARB, KR4₍₂₎, TR2, LF12, EF13 e PR2.

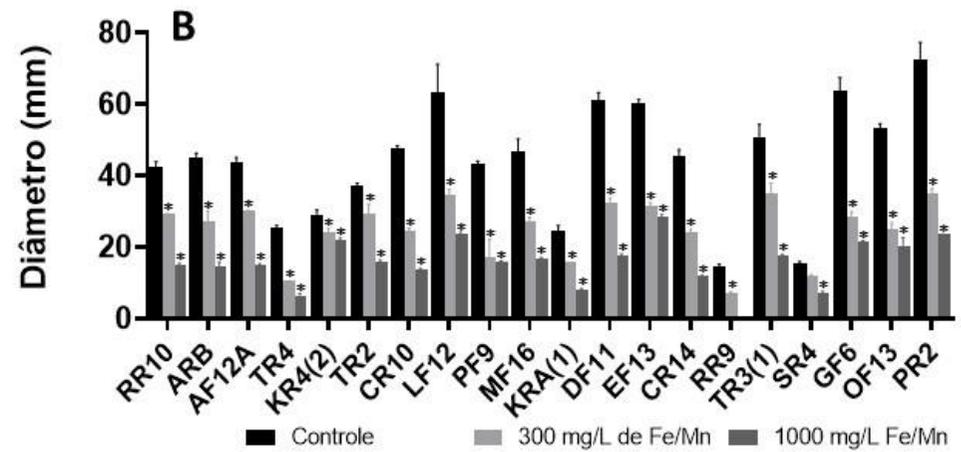
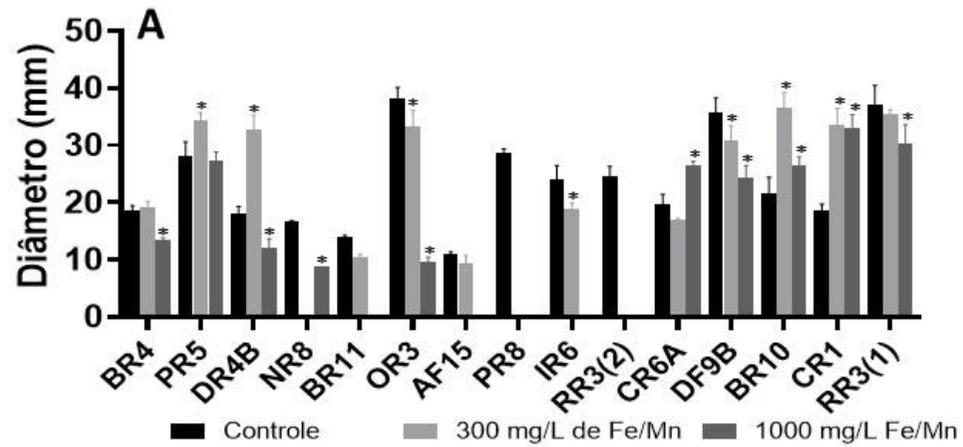


Figura 07. Crescimento dos espécimes de *Penicilium* (A) e *Aspergillus* (B) em diferentes concentrações de Fe^{+2} e Mn^{+2} . Os asteriscos (*) correspondem às médias dos tratamentos que diferiram das médias do controle.

Nos ensaios onde foram testados os meios contendo Fe^{+2} e Mn^{+2} em diferentes concentrações sobre os isolados de *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp, a presença dos dois metais foi tóxica para os isolados PR8, IR6, RR3₍₂₎, AF15, NR8 e BR11 (Figura 7A), que também foram muito afetados pelo ferro, mas não pelo manganês (Figuras 5A e 6A). Sugere-se que esta inibição do crescimento se deva então à presença de ferro no meio de cultura. Já o isolado OR3 que foi muito afetado pelo ferro (Figura 6A), mostrou um crescimento adequado quando crescido em Fe^{+2}/Mn^{+2} 300 μ g/mL, sendo seu crescimento inibido somente na concentração mais alta. Os isolados RR3₍₁₎, BR10 e CR1 apresentaram maior crescimento na presença dos dois metais no meio de cultura.

A Figura 7B mostra os resultados obtidos dos testes de resistência dos isolados de *Aspergillus* spp crescidos em meio contendo Fe^{+2} e Mn^{+2} em duas concentrações. Este gênero se mostrou sensível à mistura dos dois metais, pois todos os isolados tiveram seu crescimento inibido nas duas concentrações testadas. Os isolados mais resistentes foram LF12, EF13 e PR2. É provável que um efeito sinérgico causado pela presença dos dois metais tenha afetado o metabolismo destes organismos. No entanto desvendar os mecanismos de ação desta interferência requerem estudos posteriores muito mais aprofundados.

Teste de biorremediação de ferro (Fe^{+2}) e manganês (Mn^{+2}) em meio de cultura líquido

Crescimento Micelial em meio líquido contendo metais

Foram selecionados alguns dos isolados que apresentaram os melhores resultados do teste de resistência para realização dos testes em meio líquido, quais sejam: CR1, RR3₍₁₎ (*Penicillium*), EF13, PR2 e LF12 (*Aspergillus*). A Figura 8

mostra a massa micelial obtida durante o crescimento dos isolados em meio de cultura batata-dextrose (BD) contendo Fe^{+2} e Mn^{+2} ($10 \mu\text{g/mL}$) durante 8 dias, com retirada de alíquotas a cada 48 horas.

Foram observadas diferenças na taxa de crescimento micelial entre os isolados fúngicos na presença dos metais. Estes não influenciaram o crescimento do isolado PR2 quando comparamos com o controle. Entretanto, o isolado RR3(1) teve sua massa micelial aumentada ao longo de todo o experimento, indicando que os metais tiveram uma influência positiva no seu crescimento.

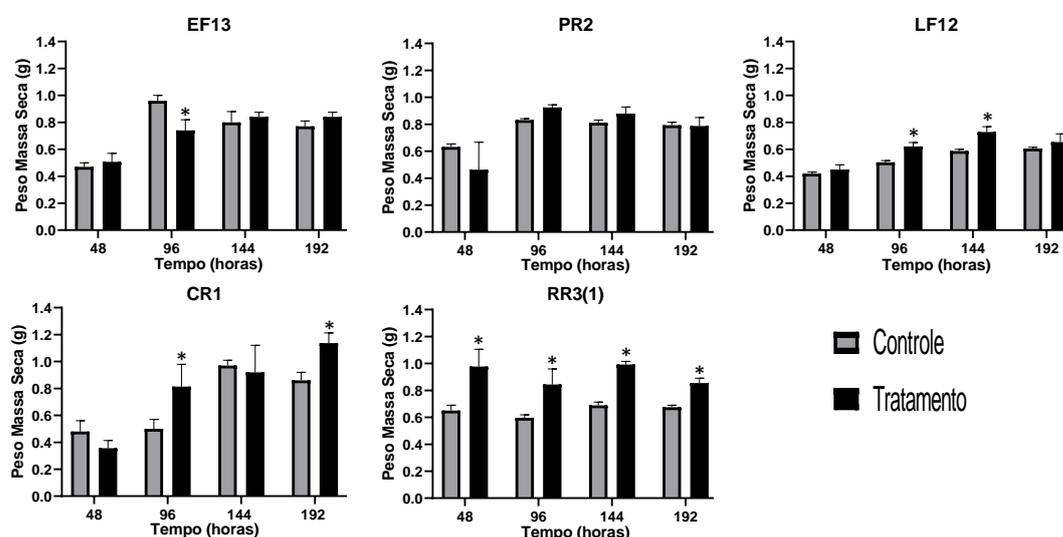


Figura 8. Massa seca dos isolados testados. O controle foi o meio inoculado com os isolados na ausência de metais. Os asteriscos (*) correspondem às médias dos tratamentos que diferiram dos controles.

O efeito dos metais pesados sobre o crescimento fúngico foi avaliado com base no ganho de biomassa seca, e todas os isolados do gênero *Aspergillus*, apresentaram comportamento muito semelhante quando comparados ao controle, sendo tolerantes à presença dos metais. Os isolados do gênero *Penicillium* apresentaram os melhores resultados quanto ao ganho de biomassa seca, sendo que o isolado RR3(1) apresentou maior crescimento micelial em comparação ao controle (Figura 8).

Os resultados obtidos mostraram que o isolado PR2 foi o único que não

apresentou diferença significativa entre massa micelial do tratamento quando comparada com a massa do controle. O isolado EF13 apresentou diferença significativa somente após 96h.

O isolado CR1 apresentou a maior massa seca dentre todos os isolados testados, quando comparado com o controle, sendo estatisticamente diferente entre os tratamentos nos tempos de 96h e 192h. O isolado LF12 apresentou comportamento oposto ao CR1, tendo os menores ganho de massa seca, apresentando diferença estatística para os tempos de 96h e 144h.

O isolado RR3₍₁₎ apresentou diferença estatística entre todos os tempos analisados, com aumento da massa micelial na presença dos metais.

Absorção de metais em meio líquido

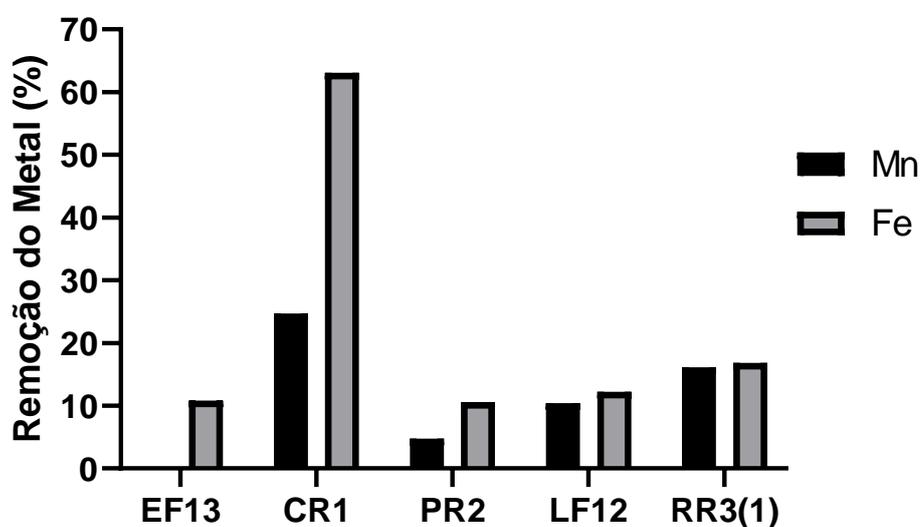


Figura 9. Percentual de remoção dos metais no meio líquido pelos isolados fúngicos.

A porcentagem de metais absorvidos pelos isolados foi obtida após filtração do meio de cultura contendo inóculo do fungo analisado durante 8 dias e estão apresentadas na Figura 9. O percentual de remoção de metais foi calculado comparando a concentração do último dia (192 h) com o padrão (0 h).

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que o isolado EF13 foi o único que não foi capaz de remover manganês, o que indica que este isolado apenas tolera a presença deste elemento.

O isolado PR2 removeu cerca de 5% de manganês e 10% de Fe^{+2} . Já o isolado LF12 removeu 12% de Fe^{+2} , e 10% de Mn^{+2} .

O isolado RR3₍₁₎ apresentou um percentual de retirada de ambos os metais de 16%, superando os demais isolados. O isolado CR1 se destacou dos demais, removendo em torno de 24% de Mn^{+2} do meio e mais de 60% de Fe^{+2} , indicando ser o melhor agente de biorremediação, dentre todos os isolados testados neste trabalho.

Discussão

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, é possível notar que houve uma grande redução na abundância do gênero *Penicillium* na área de recuperação, o que pode estar relacionado ao efeito da toxicidade dos metais para este gênero nesta área. Por outro lado, a presença destes espécimes, em sua maioria, nas raízes, sugere que alguns isolados estão mais adaptados a tolerar a presença dos metais. De acordo com Maurer (2009), a diversidade de espécies em ambientes nativos é geralmente maior do que em locais alterados, sendo influenciada conforme as variações nas condições ambientais. Em relação aos *Aspergillus*, houve um aumento da abundância na área de recuperação, sendo sua presença maior na parte aérea das plantas.

Com os resultados obtidos foi possível perceber que na área de recuperação, a qual apresenta processos de exploração mineral, houve uma redução na abundância do gênero *Penicillium*, sugerindo que os impactos causados pela mineração podem alterar a diversidade de grupos específicos de fungos endofíticos. Os dados resultantes deste trabalho, corroboram com Moura (2014), que identificou

microrganismos endofíticos associados às plantas de áreas impactadas pela mineração de carvão e de uma região não impactada (controle) a fim de avaliar seus potenciais para utilização em processos de biorremediação de áreas degradadas. Nesta pesquisa foram isolados 114 microrganismos endofíticos, sendo 54 provenientes de 4 espécies vegetais diferentes da área contaminada, e 60 de três espécies vegetais diferentes da área controle, mostrando que a região não impactada apresentou maior abundância de microrganismos.

O gênero *Aspergillus* consiste em cerca de 339 espécies, incluindo patogênicas e benéficas, compreendendo um grupo diverso e complexo de espécies em termos de caracteres morfológicos, fisiológicos e filogenéticos, com impacto significativo na biotecnologia, produção de alimentos e a saúde humana (Samson et al., 2014). *Penicillium* é outro grupo dos fungos mais difundidos, que sobrevivem em diversos habitats, variando do solo sobre a vegetação ao ar, ambientes internos e em vários produtos alimentícios Visagie et al. (2014).

Portanto, juntamente com sua natureza onipresente, essas espécies têm impactos muito significativos nos ecossistemas, agricultura, produção de alimentos, biotecnologia e saúde humana e animal (Abdel-Azeem et al. 2016).

Analisando os resultados de resistência ao Fe^{+2} , observamos que alguns isolados não cresceram ou cresceram pouco no tratamento com 1000mg/L, mostrando alta sensibilidade destes espécimes a este metal em altas concentrações. Este resultado também foi observado por Blumer (2002), que cultivou *Saccharomyces cerevisiae* em diversas concentrações de ferro e verificou que não houve inibição de crescimento nas concentrações próximas de 300mg/L. Contudo, ao aumentar a concentração para níveis acima de 900mg/L, passou a não haver crescimento.

Estudo realizado por Anahid et al. (2011) avaliou a tolerância a vários metais, incluindo Fe^{+2} e Mn^{+2} nos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus foetidus* em concentrações de 500 a 5000 mg/L e de *Penicillium simplicissimum* nas concentrações de 500 até 8000 mg/L. *A. niger* e *A. foetidus* demonstraram ser tolerantes ao metal Fe^{+2} nas concentrações de 500 mg/L, o que apoia os resultados obtidos neste trabalho. Contudo, a espécie *P. simplicissimum* não apresentou um bom índice de tolerância na concentração de 1000 mg/L de Fe^{+2} , resultado que difere de grande parte dos isolados de *Aspergillus* testados na mesma concentração neste estudo. É provável que a comunidade de espécies de endofíticos de *Aspergillus* de *A. graziellae* esteja mais adaptada às condições abióticas locais e, portanto, tenha uma resistência maior à altas concentrações de ferro.

De acordo com Oladipo et al. (2018), espécies de fungos do filo Ascomycota demonstraram preferência por ferro em várias concentrações. Isso pode ser atribuído ao fato de que o ferro é um micronutriente crucial em muitos processos metabólicos.

Diferentes espécies de fungos têm alta afinidade e capacidade de absorver Fe em várias formas e variedades. A maioria das cepas de fungos sintetiza e segrega sideróforos para extrair Fe de seu ambiente (Datta 2015). Os fungos aumentam a solubilidade do ferro acidificando o ambiente, reduzindo o ferro férrico a uma forma ferrosa e mais solúvel e secretando moléculas quelantes e solúveis (Johnson 2008).

Estudos confirmam que níveis diferentes de resistência a metais foram demonstrados por diferentes espécies de fungos isolados da mesma fonte, de sítios contaminados por metais. Isso pode ser atribuído a variações no mecanismo de tolerância específica utilizado pelos fungos (Oladipo et al. 2018). Além disso,

sensibilidade a altas concentrações de ferro podem ser atribuída à toxicidade dos metais pesados (Tomás 2014).

Os resultados do tratamento com manganês, em concentrações de 300 e 1000 mg/L (Figura 6A) confirmaram os obtidos por Anahid et al. (2011), demonstrando que este metal nas concentrações testadas, não inibiram o crescimento dos isolados fúngicos. Alguns dos isolados tiveram seu crescimento aumentado pela presença deste metal, como foi o caso de alguns *Penicillium* em presença de ferro e manganês.

Crescimento micelial em meio de cultura líquido

Foram observadas diferenças na taxa de crescimento micelial entre os isolados fúngicos na presença dos metais (Figura 8). Os metais não influenciaram o crescimento do isolado PR2 quando comparamos com o controle, entretanto, o isolado RR3₍₁₎ teve sua massa micelial aumentada ao longo de todo o experimento, indicando que os metais tiveram uma influência positiva no seu crescimento.

Kernaghan et al. (2003) e Haselwandter (2008), descobriram uma forte variação interespecífica e intraespecífica na tolerância a metais entre espécies de fungos e os rejeitos de mineração que foram usados em seus experimentos que continham altas concentrações de Fe²⁺ e Ca²⁺. O ferro é um dos metais amplamente utilizados pelos organismos vivos, participando dos processos bioquímicos-metabólicos vitais, como síntese de DNA, RNA, proteínas, transporte de elétrons, respiração, proliferação celular e regulação da expressão gênica (Machado et al. (2005); Ozment & Turi 2009; Nevitt 2011). Mas a tolerância a altas concentração deste metal varia enormemente entre os diferentes isolados/espécies. Portanto, é preciso avaliar o potencial de de cada cepa a ser utilizada na biorremediação de locais de mineração que abrangem uma variedade de partículas de rejeitos.

O isolado LF12 foi o que apresentou o menor peso de massa seca. Entretanto, seu crescimento no meio com metais foi maior que o do controle em 96 e 144 horas, indicando um certo estímulo pelo metal. O isolado EF13 apresentou comportamento semelhante, exceto pelo fato que só aumentou a massa micelial a partir de 144h. Uma outra hipótese plausível é que exista a necessidade de um tempo de adaptação da maquinaria enzimática dos isolados, para processar os metais presentes no meio. É preciso levar em conta que tais isolados convivem com a espécie *Aspilia graziellae* durante um longo período evolutivo, e estão adaptados às condições locais da origem da planta hospedeira.

EF13 apresentou o maior peso em 96 h no meio controle. Porém, a partir desse dia houve um decréscimo de sua massa. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que o espécime alcançou seu pico de massa em 96 h e a partir daí passou a ocorrer lise celular ou esgotamento do meio de cultura (Ho et al, 2014).

O isolado CR1 apresentou a maior massa seca dentre todos os isolados testados, quando comparado com o controle, sugerindo que os metais foram fortes promotores do crescimento fúngico. Este isolado é, portanto, um forte candidato a ser utilizado em processos de biorremediação de Fe^{+2} e Mn^{+2} .

Esta disparidade na tolerância ao metal pode ser atribuída aos diferentes tipos de processos de tolerância, aos mecanismos de resistência de cada isolados (Iram et al. 2009). De acordo com Ezzouhri et al. (2009), isolados do mesmo gênero podem apresentar diferenças marcantes nos níveis de resistência a metais.

Absorção de Metais do Meio Líquido

De modo geral, os isolados do gênero *Aspergillus* não se mostraram tão eficazes como os do gênero *Penicillium* na remoção de metais do meio de cultura. O

isolado CR1 apresentou melhor desempenho para remoção dos metais em meio líquido, principalmente do Fe^{+2} . Fungos com capacidade em tolerar metais podem ser usados com sucesso em processos de biorremediação, pois são uma ótima estratégia devido ao seu baixo custo e sua alta eficiência. Avanços têm sido feitos na compreensão da interação metal-microrganismo e sua aplicação na acumulação/desintoxicação (Rajendran et al. 2002).

As respostas das morfoespécies aos metais depende do tipo de isolado em estudo, do local de isolamento, do tipo de metal e sua concentração no meio (Rose et al. 2018). As informações obtidas nesta investigação podem ser úteis para refinar ainda mais os processos de biorremediação, especialmente em se tratando de locais contaminados com ferro e manganês.

Estudo realizado por Farias (2008), com duas espécies de *Aspergillus* e duas espécies de *Penicillium* para determinar seus potenciais na remoção de cobre, zinco e manganês, com concentração de 5,7 mg/L de Mn^{+2} , verificou que as melhores linhagens para remoção deste elemento foram as do gênero *Aspergillus*, resultado diferente deste trabalho, onde os isolados *Penicillium* apresentaram os melhores percentuais de remoção.

Conclusões

O processo de exploração mineral pode ser uns dos fatores para a redução da abundância dos fungos endofíticos do gênero *Penicillium* spp de *A. graziellae* encontrados neste trabalho.

O gênero *Aspergillus* se mostrou mais tolerante aos metais testados do que o gênero *Penicillium*. Contudo, para fins de biorremediação, os isolados de *Aspergillus* não foram tão eficientes na remoção dos metais em meio líquido quanto o gênero

Penicillium.

O isolado CR1 do gênero *Penicillium* mostrou ser o mais eficiente para remoção de metais, principalmente de Fe^{+2} , dentre todos os isolados testados, indicando que o mesmo apresenta um alto potencial para biorremediação de Fe^{+2} .

Estes resultados sugerem a potencial aplicabilidade da cepa CR1 para a remediação de metais pesados de solos e águas poluídos.



Mudas de *Aspilia grazielae*

Desenvolvimento de mudas de *Aspilia grazielae* (Santos) em solo inoculado com fungos endofíticos do gênero *Aspergillus sp* suplementado com solução de metais

Resumo

Dezessete endofíticos do gênero *Aspergillus* foram isolados de folhas e raízes de *Aspilia grazielae*, espécie vegetal endêmica do Pantanal. Após os testes para avaliar o índice de tolerância (IT) aos metais Fe^{+2} e Mn^{+2} no desenvolvimento micelial, três isolados foram selecionados e submetidos à identificação molecular. A análise parcial de uma sequência espaçadora transcrita interna e do gene da β -tubulina identificou os isolados sp1, sp2 e sp11 como *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus sp11*, respectivamente. Foi verificada a presença de sideróforos nas espécies em estudo. Após 72h de crescimento em placas, observou-se a presença de sideróforos em *A. niger* e *Aspergillus sp11*. Também foi realizada a determinação quantitativa da produção de sideróforos em meio líquido. Após 10 dias de incubação, *A. udagawae*, *A. niger* e *Aspergillus sp11* produziram 25%, 78% e 84% de unidades de sideróforos, respectivamente. Foram realizados estudos em vasos para observar o efeito dos inóculos fúngicos em mudas de *A. grazielae* tratadas com soluções de sais de metais. Nos experimentos com a adição de soluções de Fe^{+2} , observou-se que os parâmetros altura da planta, peso da raiz, peso total da parte aérea, ganho de biomassa, matéria seca da raiz, matéria mineral das folhas e matéria mineral da raiz, diferiram significativamente entre os tratamentos controle, na ausência e na presença dos isolados fúngicos e dos tratamentos com metal. Os mesmos parâmetros também foram analisados com tratamentos com soluções de Mn^{+2} , observando-se um aumento significativo no crescimento das plantas. Os tratamentos com os isolados fúngicos na ausência dos metais apresentaram um incremento de 8,7% no ganho de peso da biomassa, enquanto os tratamentos com a presença de Fe^{+2} e Mn^{+2} apresentam um ganho de 18,21% e 13,3% quando comparados aos tratamentos com ausência de fungos no solo. Observou-se que a adição dos fungos endofíticos no solo também promoveram uma melhora nas características morfológicas das plantas, demonstrando que os mesmos apresentam potencial como promotores de crescimento vegetal.

Palavras Chave: Crescimento Vegetal, Interação Fungo-Planta, Sideróforos

Abstract

Seventeen endophytes of the genus *Aspergillus* were isolated from leaves and roots of *Aspilia grazielae*, an endemic plant species in the Pantanal. After tests to evaluate the tolerance index (TI) to Fe^{+2} and Mn^{+2} metals in mycelial development, three isolates were selected and subjected to molecular identification. The partial analysis of an internal transcribed spacer sequence and the β -tubulin gene identified isolates sp1, sp2 and sp11 as *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus* sp11, respectively. The presence of siderophores in the species under study was verified. After 72 h of growth in plaques, the presence of siderophores in *A. niger* and *Aspergillus* sp11 was observed. Quantitative determination of the production of siderophores in liquid medium was also carried out. After 10 days of incubation, *A. udagawae*, *A. niger* and *Aspergillus* sp11 produced 25%, 78% and 84% of siderophore units, respectively. Pot studies were carried out to observe the effect of fungal inocula on *A. grazielae* seedlings treated with metal salt solutions. In experiments with the addition of Fe^{+2} solutions, it was observed that the parameters plant height, root weight, total aerial part weight, biomass gain, dry root matter, leaf mineral matter and root mineral matter, differed significantly between control treatments, in the absence and presence of fungal isolates and metal treatments. The same parameters were also analyzed with treatments with Mn^{+2} solutions, observing a significant increase in plant growth. Treatments with fungal isolates in the absence of metals showed an increase of 8.7% in biomass weight gain, while treatments with the presence of Fe^{+2} and Mn^{+2} showed a gain of 18.21% and 13, 3% when compared to treatments with no fungi in the soil. It was observed that the addition of endophytic fungi in the soil also promoted an improvement in the morphological characteristics of the plants, demonstrating that they have potential as promoters of plant growth.

Key words: Plant Growth, Fungus-Plant Interaction, Siderophores

Introdução

Aspilia grazielae (Santos) (Astereaceae) é um arbusto arbóreo da flora brasileira (Santos 2001; Hind & Miranda 2008), encontrada em uma região de transição entre os biomas Cerrado e Pantanal, e, encontra-se ameaçada de extinção pelo avanço de atividades de mineração (Brasil 2014; Roque et al. 2018). É uma espécie endêmica da região conhecida como Maciço do Urucum, onde se encontram grandes jazidas de ferro e manganês. *Aspilia grazielae* cresce tanto nas áreas de mata nativa quanto nas áreas de recuperação, sendo uma espécie pioneira amplamente utilizada nos processos de revegetação de áreas onde o solo foi totalmente revolvido para extração de ferro e manganês. Poucas pesquisas são relatadas a esta espécie vegetal, restringindo-se apenas à lista de verificação (Farinaccio et al. 2018) e ao seu endemismo (Santos 2001).

A atividade mineradora no Brasil é responsável por quase 5% do PIB, mas por outro lado, traz consigo questões ambientais que devem ser avaliadas (Fink et al, 2016). A mineração a céu aberto afeta os sistemas geoquímicos, biológicos e hidrológicos, causando degradação do solo e danos à vegetação (Haigh, 2017; Faucon et al. 2016; Cross et al. 2017). Concentrações elevadas de ferro no solo formam barreiras contra o próprio minério (Tripathi et al. 2014) e inibem a absorção de outros nutrientes danificando as raízes das plantas (Chalmardi et al. 2014). A toxicidade do metal reduz a fotossíntese, afeta a produção e utilização de enzimas e proteínas, altera o transporte de nutrientes, influenciando o funcionamento celular, interferindo diretamente os mecanismos de absorção e translocação (Gupta et al. 2018).

O manganês é outro minério enquadrado entre as principais fontes poluidoras do meio ambiente, quando em excesso, e está envolvido no processo de produção de

aço e ferro (Howe; Malcolm; Dobson, 2005). Nos ecossistemas aquáticos e terrestres representa uma ameaça quando em excesso, sendo considerado contaminante tóxico emergente do meio ambiente (Bordean et al. 2014).

A utilização de plantas adaptadas a altas concentrações de metais é uma alternativa eficaz para reduzir os impactos causados pela mineração. (Raskin et al., 1994). Este processo, conhecido como fitorremediação, apresenta vantagens, tais como, baixo custo, melhoria no ambiente a ser tratado, redução do impacto ambiental e fácil manuseio (Ahmad et al. 2018).

Além dos mecanismos que as próprias plantas possuem para sobreviverem em ambientes com altas concentrações de metais, elas também são altamente dependentes dos microrganismos do solo, e a sinergia entre ambos é fundamental para sua adaptação e resiliência em ambientes estressantes (Rajendhran e Gunasekaran, 2008). Os exsudatos radiculares influenciam na composição das comunidades microbianas podendo alterar sua diversidade, melhorando o desempenho das plantas (Ahmad et al. 2018).

Além dos fungos do solo, a descoberta da existência dos fungos endofíticos contribuiu para elucidar alguns dos inúmeros benefícios que existe nesta relação simbiótica, tão importante para os ecossistemas terrestres, e que está em evolução há mais de 100 milhões de anos (Martin et al. 2017; Khare et al. 2018) Os fungos endofíticos crescem de forma assintomática dentro do seu hospedeiro, contribuindo para o aumento da absorção de nutrientes (Peay et al. 2016; Ikram et al. 2019) e para o desenvolvimento e crescimento da planta frente às condições bióticas e abióticas a que são submetidas (Morsy et al. 2010; Khare et al. 2018).

Os benefícios proporcionados pelos fungos endofíticos à planta hospedeira, estão relacionados à promoção de crescimento através da síntese de fitormônios

(Herrera et al. 2016; Xia et al. 2019), solubilização de macro e micronutrientes (Radhakrishnan et al. 2015; Aznar & Dellagi 2015), produção de enzimas (Strobel 2018), proteção contra fitopatógenos e herbívoros (SaÂnchez-FernaÂndez et al. 2016; Vurukonda et al. 2018), salinidade e a seca. São capazes de mitigar os efeitos causados pela exposição a fatores abióticos extremos, como metais pesados (Khare et al, 2018) e mesmo que o microrganismo não tenha capacidade de tolerar o metal pesado, sua relação com a espécie vegetal permite melhorar seu desenvolvimento no ambiente contaminado (Ojuederie & Babalola 2017).

Para solubilizar e sequestrar esses metais, muitos microrganismos utilizam um sistema próprio e eficiente de aquisição de metais; uma dessas estratégias é a produção de sideróforos (Hipol et al. 2019), que são pequenas moléculas que possuem grupos funcionais que se ligam a íons férricos (Årstøl & Hohmann-Marriott 2019). São compostos do metabolismo secundário produzidos por algumas espécies de microrganismos, cuja função principal é complexar metais, em especial ferro em estado insolúvel (Sharma et al. 2013; Santos et al. 2014). São moléculas que diferem em suas estruturas e propriedades químicas, classificadas em catecolatos, α -hidroxicarboxilatos, hidroxamatos (Figura 1) ou uma fusão destas estruturas (Hider & Kong, 2010).

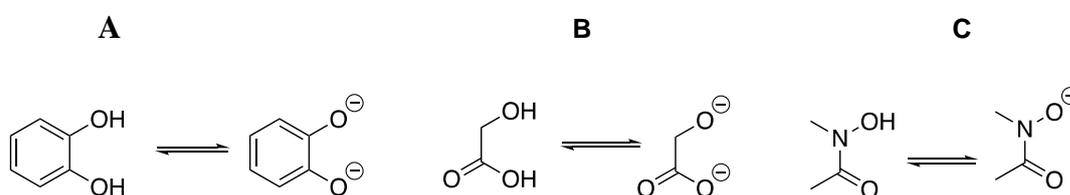


Figura 1. Classe dos Sideróforos: A – catecolato, B – α -hidroxicarboxilato e C – hidroxamato (adaptado de Hider e Kong, 2010).

A obtenção de Fe começa com os sideróforos liberados se ligando ao íon férrico. Em seguida, proteínas receptoras específicas presentes na superfície das

células os reconhecem e translocam por transporte ativo (Wilson et al 2016).

O uso de fungos produtores de sideróforos pode ajudar a melhorar a deficiência de ferro, o crescimento das plantas e o rendimento de culturas economicamente importantes. Os sideróforos, além de seu papel no transporte ativo de ferro, podem atuar como antagonistas do crescimento, sequestrando o ferro do ambiente, restringindo o crescimento de patógenos (Ferreira, Silva & Cunha 2019; Barroso & Nahas 2005; Ahmed & Holmström 2014).

Diferentes mecanismos são utilizados pelos microrganismos para aumentar a captação de Fe pelas plantas. Sob condições de baixa disponibilidade de ferro, os sideróforos podem solubilizar o Fe a partir de minerais e compostos orgânicos (Khan et al., 2009a). Os sideróforos também formam complexos estáveis com metais pesados, aliviando o efeito tóxico (Rajkumar et al., 2010).

Fitormônios, como o ácido indolacético (IAA), etileno, ácido abscísico, citocininas e giberelinas produzidos pelos microrganismos atuam de maneira direta sobre os processos fisiológicos das plantas e estão envolvidos no seu crescimento (Kang et al., 2010), influenciando na divisão e aumento celular, germinação de sementes, formação de raízes e alongamento do caule (Taiz e Zeiger, 2000; Khalid et al., 2006). A eficácia desses fitormônios produzidos por microrganismos no melhoramento da produtividade das culturas é bem documentada (Zahir et al., 2007, 2010; Jamil et al., 2018).

Diante deste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de morfoespécies de fungos endofíticos no desenvolvimento de plântulas de *A. grazielae* suplementadas com soluções de Fe^{+2} e Mn^{+2} .

Material e Métodos

Isolamento e identificação morfológica dos isolados

Os fungos endofíticos filamentosos do gênero *Aspergillus* sp foram isolados de folhas e raízes de *A. graziellae*. Esta espécie é nativa do Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul e as amostras foram coletadas no município de Corumbá-MS (19° 00' 33" S; 57° 39' 12" W), na região das morrarias do Maciço do Urucum.

As folhas e raízes foram lavadas superficialmente com detergente neutro e posteriormente desinfetadas de acordo com protocolo padrão para isolamento de fungos endofíticos (Bacon e White, 2000; Deng et al. 2014; Khan et al. 2017). Os fragmentos vegetais foram plaqueados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados em BOD à 28°C por um período de 7 dias.

As microestruturas somáticas e reprodutivas foram observadas através de microcultivos (Dalmau 1929; Riddell 1950), utilizando chave de identificação descrita por Raper e Fennell (1977) e sistema de classificação proposto por Hawksworth (1995).

Identificação molecular - extração, amplificação e seqüenciamento do rDNA da região ITS dos fungos endofíticos

Para a extração de DNA genômico os isolados foram inoculados em meio líquido (Pontecorvo et al., 1953) e incubados a 28°C, por 48 h. O DNA genômico foi extraído de acordo com Azevedo et al. (2000). Os DNAs isolados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TEB 1x de acordo com Sambrook & Russel (2001). Os géis foram tratados com brometo de etídio e as bandas visualizadas sob luz UV.

A reação de PCR para amplificação da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA foi realizada em um volume final de 25 µL, utilizando os primers ITS1 Forward 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3' e ITS4 Reverse 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (White et al. 1990) e β-tubulina Bt2a Forward 5'-GGT AAC CAA ATC

GGT GCT GCT TTC-3' e Bt2b Reverse 5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3' (Glass & Donaldson 1995). Para a reação foram utilizados 5 µL de tampão para PCR (10X); 2,5 µL MgCl₂ (25 mM); 1 µL de dNTP (10 mM); 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U); 1,0 µL de cada iniciador (10 pmol/µL); 5 µL de DNA (10-50 ng). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) programado para desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s, hibridação a 56°C por 15s e extensão a 72°C por 30s. As amostras então foram incubadas a 72°C por 7 min seguido de resfriamento a 4°C.

A reação de PCR para amplificação da região gênica da β-tubulina foi idêntica à reação anterior, e após esse processo as amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 15s e extensão a 72°C por 2 min. As amostras foram então incubadas a 72°C por 5 min seguido de resfriamento a 4°C. Os produtos de PCR foram enviados para o Laboratório de Genética e Bioquímica da EMBRAPA Agrobiologia em Seropédica, RJ, para o sequenciamento.

*Ação dos metais ferro (Fe^{+2}) e manganês (Mn^{+2}) sobre o crescimento micelial dos endofíticos de *Aspergillus sp* em meio sólido*

A tolerância dos fungos isolados aos metais foi avaliada por estudos da ação de cada metal separadamente e em conjunto sobre o crescimento das culturas de *Aspergillus sp* em meio BDA acrescidas de soluções metálicas, acrescido dos metais de interesse para obtenção das concentrações de 300 mg.L⁻¹ e 1000 mg.L⁻¹. O controle do experimento foi feito em placas sem a adição dos metais.

Após a inoculação dos fungos, as placas foram mantidas em estufa BOD, a 28°C e fotoperíodo de 12h horas. O crescimento radial do micélio foi avaliado a cada

24 horas até a fase estacionária, com auxílio de um paquímetro (Neirotti & Azevedo 1988). A taxa de crescimento micelial foi calculada durante a fase exponencial e seu valor foi usado para determinar o índice de tolerância (IT) das cepas (Soares et al. 2016). As linhagens com os maiores ITs foram selecionadas para avaliação da promoção do crescimento das plantas. O experimento foi executado com três repetições para cada tratamento.

Deteção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada utilizando o método Chrome Azurol S(CAS) desenvolvido por Schwyn e Neilands (1987), posteriormente modificado por Alexander e Zuberer (1991). Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo o meio Czapek sólido modificado, com solução de CAS (15% v/v) e ausência de ferro, e incubados a 72h à 30°C. Após esse período, halos ao redor das colônias com coloração alaranjada e rosa/violeta indicaram resposta positiva para a produção de sideróforos.

Os isolados também foram cultivados em meio líquido em erlenmeyers (50 mL) isento de ferro para a quantificação da produção de sideróforos, de acordo com o método descrito por Grimn e Allen (1954). Os frascos foram incubados à 30°C em agitador orbital (110 rpm) e as leituras para determinação dos sideróforos foram realizadas em intervalos de 5 e 10 dias.

Após o tempo de incubação, as culturas foram filtradas à vácuo com papel filtro (Whatman nº1) e o filtrado utilizado para análise da produção de sideróforos. Aliquotas de 0,5 mL do filtrado das culturas foram homogeneizadas com 0,5 mL da solução de CAS. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, a mudança da coloração foi observada e 200 µL das amostras foram aplicadas em placas de 96

poços e as leituras das absorvâncias foi realizada em comprimento de onda de 630 nm. O branco foi preparado sem a adição de filtrado de culturas (Grimn & Allen 1954). A porcentagem de sideróforos foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Unidade de Sideróforos} = (\text{Ar}-\text{Aa})/\text{Ar} \cdot 100$$

onde,

Ar = Absorvância de referência e

Aa = Absorvância da amostra.

Influência dos endofíticos no crescimento de mudas de A. grazielae suplementadas com soluções de ferro (Fe^{+2}) e manganês (Mn^{+2})

Sementes de *A. grazielae* foram desinfectadas (imersão em etanol a 70% por 1min, hipoclorito de sódio a 2,5% por 5min e enxaguadas em água destilada esterilizada) e germinadas em vasos de 0,5 dm³ contendo vermiculita e areia 1:1 (v/v).

Após vinte dias, as mudas com aproximadamente 10 cm de comprimento foram transferidas para vasos plásticos (11 cm diâmetro e 15 cm de altura) contendo solo autoclavado, em condições de campo. Três dias antes do plantio das mudas, foi adicionado ao solo 1 mL de solução de esporos, na concentração de 2×10^6 conídios/mL⁻¹ de cada uma das cepas de *Aspergillus* sp selecionadas, aqui denominadas sp1, sp2 e sp3 (uma mistura com as três cepas). Esse período de três dias permitiu a germinação dos esporos fúngicos. Após esse período as mudas foram transplantadas nos vasos e cultivadas durante 5 dias na ausência dos metais (período de aclimatação). Após este período, iniciou-se a suplementação com uma solução de Fe^{+2} ou de Mn^{+2} na concentração de 300 mg.L⁻¹.

A irrigação foi diária, utilizando 50 mL da solução de metal pela manhã e 50 mL no período da tarde. Os controles compreenderam vasos com ausência (C1) e

presença (C2) dos isolados fúngicos no solo e livres da irrigação com a solução de metais, para efeito de comparação.

A avaliação do efeito da inoculação dos isolados sobre as mudas foi realizada aos 30 dias após o início da irrigação com a solução de metais. As medidas de resposta das plantas na presença e ausência dos endofíticos fúngicos e aos metais foram:

- i) comprimento da raiz – CR (cm);
- ii) número de folhas - NF;
- iii) distância entre nós – DN (cm); medida com régua milimétrica,
- iv) diâmetro do caule – DC (mm), obtido por meio de paquímetro digital,
- v) altura da planta – AP (cm);
- vi) peso total da raiz – PTR (g);
- vii) peso total da parte aérea - PTPA (g), avaliados com balança digital analítica de precisão;
- viii) ganho de peso da biomassa - GPB (g);
- ix) massa seca das folhas - MSF (%);
- x) massa seca da raiz – MSR (%), determinadas após secagem em estufa a 65°C até atingir uma massa constante;
- xi) matéria mineral da folha – MMF (%) e
- xii) matéria mineral da raiz – MMR (%).

A porcentagem de promoção de crescimento foi calculada para avaliar o efeito da inoculação dos fungos no crescimento das plantas (Almoneafy et al. 2014) pela seguinte fórmula:

$$\text{EPC (\%)} = [(G_T - G_C) / G_C] * 100$$

onde,

EPG refere-se à eficácia da promoção do crescimento,

G_T refere-se aos parâmetros de crescimento no grupo tratado com isolados das cepas de *Aspergillus* selecionados e

G_C refere-se aos parâmetros de crescimento no grupo controle.

Análise dos dados

As sequências foram analisadas no programa BLAST contra a base de dados do NCBI (National Center for Biothenology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratmentos sendo: Fe^{+2} 300 mgL^{-1} sem fungo (T1), Fe^{+2} 300 mgL^{-1} com fungo (T2), controle sem fungo (C1) e controle com fungo (C2) em 10 repetições compostas por uma muda de *A. grazielae*. O mesmo delineamento foi realizado para o Mn^{+2} . Efetuou-se análise de variância e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 6.

Resultados

Identificação morfológica e molécula dos fungos endofíticos

Após isolamento dos fungos endofíticos, foram identificados morfológicamente 67 isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus*, sendo nove encontrados nas raízes e oito nas folhas. Estes foram agrupados em 17 morfoespécies.

Ação dos metais sobre o crescimento micelial dos isolados de Aspergillus sp

O teste de tolerância aos metais (Tabela 1) indicou que as concentrações de Fe^{+2} 1000 mg.L^{-1} , Mn^{+2} 1000 mg.L^{-1} e $\text{Fe}^{+2}/\text{Mn}^{+2}$ 1000 mg.L^{-1} foram responsáveis pelos menores índices de tolerância (IT) para todos os isolados testados.

Tabela 1 Efeito da dosagem de metais (Fe^{+2} e Mn^{+2}) na inibição do crescimento micelial dos isolados de *Aspergillus*, em 96 horas de crescimento

<i>Aspergillus spp</i>	CONTROLE	Fe		Fe		Mn		PIC	Fe/Mn		Fe/Mn		
		300	IT	1000	IT	300	IT		300	IT	1000	IT	
sp1	47,4	33,1	0,7	22,3	0,5	39,0	0,8	26,5	0,6	31,3	0,7	13,7	0,3
sp2	50,6	38,0	0,8	22,6	0,4	41,7	0,8	35,3	0,7	35,0	0,7	17,6	0,3
sp3	36,3	22,9	0,6	0,0	0,0	31,3	0,9	15,4	0,4	21,0	0,6	0,0	0,0
sp4	42,3	28,4	0,7	0,0	0,0	36,0	0,9	20,0	0,5	19,5	0,5	0,0	0,0
sp5	33,3	20,2	0,6	0,0	0,0	22,6	0,7	12,3	0,4	20,3	0,6	0,0	0,0
sp6	72,5	39,5	0,5	20,7	0,3	66,3	0,9	40,8	0,6	34,9	0,5	23,5	0,3
sp7	17,6	8,7	0,5	0,0	0,0	13,3	0,8	8,1	0,5	9,4	0,5	0,0	0,0
sp8	31,0	23,0	0,7	2,8	0,1	32,3	1,0	26,0	0,8	22,9	0,7	0,0	0,0
sp9	14,7	11,0	0,7	0,0	0,0	11,3	0,8	11,3	0,8	7,2	0,5	0,0	0,0
sp11	53,4	30,3	0,6	17,2	0,3	47,3	0,9	31,9	0,6	24,9	0,5	20,4	0,4
sp10	41,2	29,2	0,7	8,3	0,2	0,0	0,0	17,4	0,4	22,8	0,6	0,0	0,0
sp12	59,3	28,1	0,5	0,0	0,0	46,7	0,8	32,1	0,5	26,9	0,5	2,6	0,0
sp13	36,4	14,4	0,4	0,0	0,0	31,3	0,9	16,5	0,5	11,9	0,3	2,7	0,1
sp14	42,7	26,4	0,6	5,4	0,1	0,0	0,0	17,7	0,4	20,1	0,5	9,5	0,2
sp15	50,9	30,2	0,6	5,4	0,1	36,5	0,7	18,1	0,4	21,4	0,4	0,0	0,0
sp16	38,4	23,2	0,6	0,0	0,0	31,4	0,8	17,6	0,5	22,8	0,6	0,0	0,0
sp17	63,7	35,7	0,6	20,7	0,3	30,3	0,5	25,0	0,4	28,3	0,4	21,3	0,3

* IT – Índice de tolerância

De acordo com os resultados obtidos, os isolados sp1, sp2 e sp11 apresentaram os melhores IT na concentração de 300 mg.L^{-1} de Fe^{+2} e Mn^{+2} (Figura 2). A maior intensidade na germinação dos esporos foi da morfoespécie sp2 na concentração de 300 mg.L^{-1} de Fe^{+2} , enquanto que sp1 e sp11 apresentaram comportamento semelhante, quando comparados com a placa controle nas mesmas condições, ocorrendo crescimento das hifas e, conseqüentemente, formação de micélio. Também foi observado que a morfoespécie sp11 produziu um pigmento vermelho nos meios contendo ferro (Figura 3).

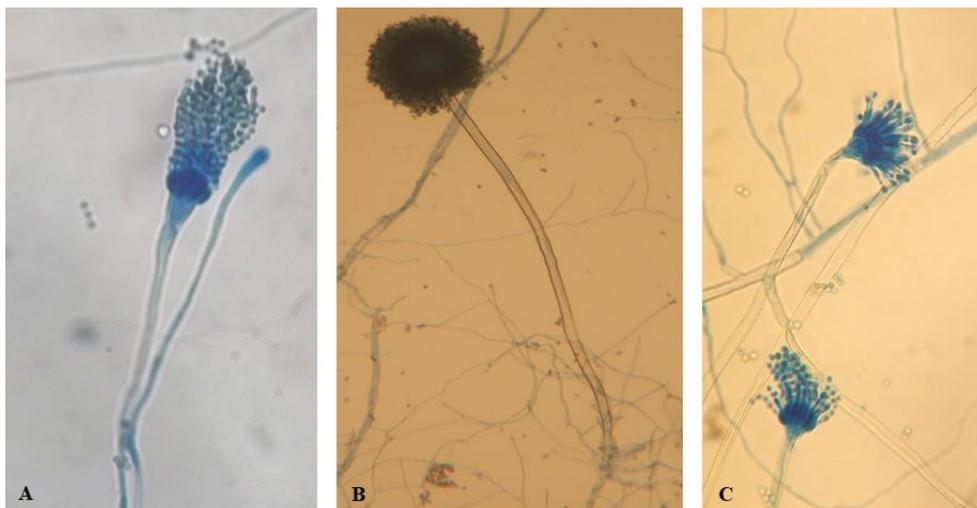


Figura 2. Conídioforos dos isolados do gênero, *Aspergillus* sp., vistos em microscópio óptico pela técnica de microcultivo (40x). A imagem A corresponde ao isolado sp1, B ao isolado sp2 e C ao sp3

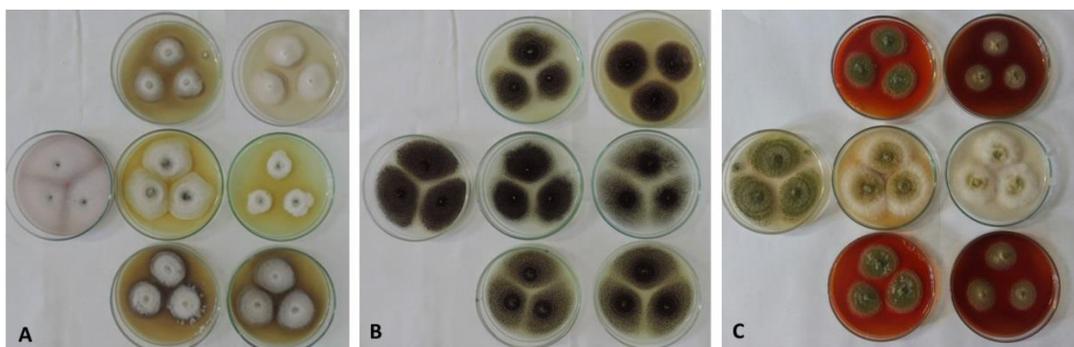


Figura 3. Placas inoculadas com esporos das morfoespécies de *Aspergillus* (A - *Aspergillus udagawae*, B - *Aspergillus niger* e C - *Aspergillus* sp3 em diferentes concentrações de Fe e Mn. O teste de resistência foi realizado com concentrações de 300 mg/L de Fe; 1000 mg/L de Fe; 300 mg/L de Mn; 1000 mg/L de Mn; 300 mg/L de Fe + 300 mg/L de Mn e 1000 mg/L de Fe + 1000 mg/L de Mn no meio de crescimento. O teste controle foi o meio BDA na ausência de metais

Identificação Molecular de sp1, sp2 e sp11

Os três isolados foram submetidos à análise molecular através do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS4 e β - tubulina. Os resultados das sequências obtidas estão apresentados na Tabela 2. A análise das sequências mostrou que o isolado sp1 teve uma identidade de 99,42% com *Aspergillus udagawae* (KY808572.1) na região β - tubulina, não amplificando a região ITS. O isolado sp2 apresentou 100,00% de similaridade com *Aspergillus niger* (MT316340.1) na região

ITS e 99.62% (JX545078.1) para β – tubulina. O isolado sp11 não amplificou com nenhuma das sequências utilizadas. As sequências dos isolados identificados com os índices de similaridade a partir do BLAST estão em anexo (Tabela 3). As sequências obtidas foram depositadas no GenBank e obtiveram os números ID: 2380503 (*Aspergillus udagawae*), MT965558 e ID: 2380507 (*Aspergillus niger*) e *Aspergillus sp11* está aguardando sequenciamento.

Tabela 2. Sequência genética dos isolados endofíticos sp1 e sp2 para as regiões ITS1-5.8S-ITS4 e β -Tub.Sequência obtida a partir do primer da região β _TubF para o isolado sp1

CGTCCCCTAATCACTGCTTGTATGATGGGAGATTAGGACCTGTATCCTAGCAGGCTTTCCTCCATGGTTTCA GCGTCGCTGTGATGGGTATC
 AGCTAACAAATTTACAGGCA GACCA TCTCTGGTGA GCA CGGCCTTGA CGGCTCTGGCCAGTAA GTTCGACCTTTATCCTCCCAATTGAGAA
 AGCGGGGAAACA CGATAGGCAAGCAGGAAGAGGGCGCGTGTCTGATGAGGATAATAGCTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGC
 GTATGAACGTCTATTTCAACGAGGTGCGTGGATGAAACTCGACTCTACA CTACTTCGGCAACATCTCACGATCTGACTCGCTACTAGGCCA
 ACGGCGACAAATATGTTCCCTCGTGCCGTTCTGGTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGCGAGCTCTCCG
 TCCCACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGCTGGTAACTGGGCCAAGGGTCACTACA CTGAGGGTAAATA

Sequência obtida a partir do primer da região ITS1-5.8S-ITS4 para o isolado sp2

GCTTTAGGAAGGTCGGGGTCTTTGGGCCAACCTCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTGCGCCGCCGGGG
 GGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGGCCCGGAGACCCCAACACGAACTGTCTGAAAGCGTGCA GTCTGAGTTGATTGAAATGCAATCAG
 TTA AAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCA GAATTCAGT
 GAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA TTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT
 GTGTTGGTTCGCGTCCCCCTCTCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCA GCGGCGGCA CCGGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAAT
 GCTCTGATGATGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA CCGCTGAACTTAAG

Sequência obtida a partir do primer da região β _TubF para o isolado sp2

TCGTTATAACCTGCCATTGGATTGGGATGGAAACATCGTCTCTTAGGCTATCTCAGCTTGA GTTCAGATGTTGTCCATTAGGTACATGCTAT
 CGGTCTAAGAACACGCTCAACAATTCAACAGGCA GACCA TCTCTGGCGAGCAGGCCTTGA CGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTCA
 CACTCTCAATTGGTCAACAATGGGCAAGGGTGGGTCTTCTGACACGCA GGATAGTTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGC
 ATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGAGATCCATCGGACCTTTGCTTTTACACGACAATATCATCAATGTCCTAATCACTTCAGCAGGCTAG
 CGGTAAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTCCTCGTCGACCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGCCAGCTCTCCGC
 CCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACTGGGCCAAGGGTCACTACA CTGAGGGTCCATA

Tabela 3. Índice de similaridade dos isolados endofíticos sp1 e sp2 para as regiões ITS1-5.8S-ITS4 e β -Tub.

Isolado endofítico sp1 (β -TubF)						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Aspergillus udagawae</i>	941	941	97%	0.0	99.42%	KY808572.1
<i>Neosartorya cf. udagawae</i>	924	924	97%	0.0	98.84%	KT253239.1
<i>Aspergillus udagawae</i>	920	920	95%	0.0	99.41%	KY808584.1
<i>Neosartorya udagawae</i>	918	918	97%	0.0	98.65%	KJ572796.1
<i>Aspergillus udagawae</i>	915	915	94%	0.0	99.41%	MK451259.1
<i>Aspergillus udagawae</i>	909	909	95%	0.0	99.02%	KY808579.1
<i>Aspergillus udagawae</i>	909	909	94%	0.0	99.21%	KY808578.1
<i>Aspergillus udagawae</i>	904	904	94%	0.0	99.01%	MK451179.1
<i>Aspergillus udagawae</i>	902	902	97%	0.0	98.07%	KY808590.1
<i>Aspergillus udagawae</i>	900	900	94%	0.0	98.81%	KY808574.1
Isolado endofítico sp2 (ITS1-5.8S-ITS4)						
<i>Aspergillus niger</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MT316340.1
<i>Alloteropsis cimicina</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MK748313.1
<i>Alloteropsis cimicina</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MK775046.1
<i>Aspergillus sp.</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MK775027.1
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MT102664.1
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MK450668.1
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MK450665.1
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MK450664.1
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MK450663.1
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	996	996	100%	0.0	100.00%	MK450662.1
Isolado endofítico sp2 (β -TubF)						
<i>Aspergillus niger</i>	955	955	98%	0.0	99.62%	JX545078.1
<i>Aspergillus niger</i>	955	955	98%	0.0	99.62%	JX545076.1
<i>Aspergillus niger</i>	955	955	98%	0.0	99.62%	JX463319.1
<i>Aspergillus niger</i>	955	955	98%	0.0	99.62%	JX463298.1
<i>Aspergillus niger</i>	955	955	98%	0.0	99.62%	HQ632698.1
<i>Aspergillus niger</i>	952	952	98%	0.0	99.43%	AY820005.1
<i>Aspergillus niger</i>	950	950	98%	0.0	99.43%	KX231822.1
<i>Aspergillus niger</i>	950	950	98%	0.0	99.43%	HQ632739.1
<i>Aspergillus niger</i>	948	948	98%	0.0	99.43%	AY820002.1
<i>Aspergillus niger</i>	944	944	96%	0.0	99.81%	KY990205.1

Ensaio qualitativos e quantitativos para produção de sideróforos

A detecção da produção de sideróforos foi feita primeiramente em meio de cultura sólido, a partir do método CAS. Os resultados indicaram que os isolados *Aspergillus niger* e *Aspergillus sp11* foram capazes de produzir sideróforos no meio, que difundiram para o meio azul CAS e interagiram com o corante, resultando na cor do meio CAS em rosa e alaranjado (Figura 4).

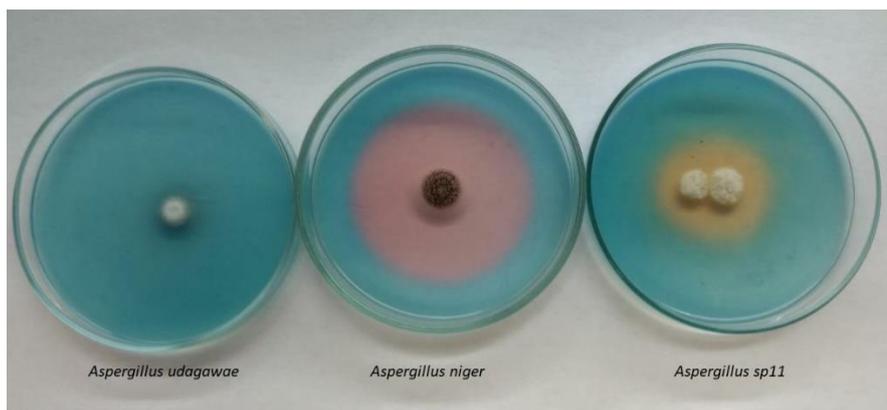


Figura 4. Características dos sideróforos dos isolados fúngicos. Os sideróforos produzidos pelo *Aspergillus niger* crescido em placa contendo meio Czapek sólido modificado, com solução de CAS (15% v/v) na ausência de ferro apresentam tonalidade rosa após 3 dias de incubação, enquanto aqueles produzidos pelo *Aspergillus sp11* apresentaram tonalidade alaranjada sob as mesmas condições.

As diferenças nas respostas da reação CAS (rosa ou alaranjado) observada entre os microrganismos poderiam estar relacionadas as diferenças estruturais dos sideróforos produzidos por cada cepa. As diferentes cores produzidas no ágar-CAS sugeriram a produção de sideróforos de naturezas diferentes, enquanto a intensidade da cor poderia estar relacionada à concentração dos sideróforos.

Quantitativamente, os três isolados mostraram capacidade de produzir sideróforos nos dois períodos avaliados, como podemos observar na Tabela 4.

Tabela 4. Produção de unidades de sideróforos (U.S %) pelos isolados de *Aspergillus* em 5 e 10 dias após o período de incubação.

Isolados	U.S. (%)	
	5º dia	10º dia
<i>Aspergillus udagawae</i>	3,43	24,96
<i>Aspergillus niger</i>	11,76	77,75
<i>Aspergillus sp11.</i>	23,04	83,9

O isolado *Aspergillus sp11* apresentou os maiores valores de unidade de sideróforos, em porcentagem, com 5 e 10 dias de incubação.

Efeito dos endofíticos Aspergillus udaguawae, Aspergillus niger e Aspergillus sp11 no crescimento de mudas de A. grazielae suplementadas com soluções de (Fe⁺²) e (Mn⁺²)

A Tabela 5 mostra os resultados dos parâmetros analisados na presença e ausência de fungos e metais durante o crescimento e desenvolvimento das mudas de *A. grazielae*. Nos experimentos com a adição de solução de Fe⁺², observou-se que os parâmetros altura da planta, peso da raiz, peso total da parte aérea, ganho de peso de biomassa, matéria seca da raiz, matéria mineral das folhas e matéria mineral da raiz, diferiram significativamente ($p < 0.05$) entre os tratamentos C1, C2, T1Fe e T2Fe.

Tabela 5 Efeito dos isolados endofíticos do gênero *Aspergillus* nos parâmetros relacionados à promoção de crescimento de mudas de *A. grazielae*, 30 dias após a inoculação, suplementadas com solução de Fe⁺² 300 mg.L⁻¹

Variáveis	Tratamentos			
	Controle sem Fungo (C1)	Controle com Fungo (C2)	Fe sem fungo (T1Fe)	Fe com fungo (T2Fe)
Comprimento da raiz (cm)	23±6,1a	22,7±4,6a	24,3±3,2a	26,6±4,5a
Número de folhas	10,8±1,1a	12±0,0a	10,8±1,0a	11±1,4 a
Distância ente nó (cm)	12,5±2,0a	11,6±2,8a	14±1,4a	12,8±2,5a
Diâmetro Caule (mm)	4,7±0,6a	4,5±0,6a	4,6±0,5a	5,0±0,5a
Altura da planta (cm)	37,1±1,4b	35±3,5b	40,8±2,2a	41,6±1,7a
Peso total da raiz (g)	12,8±0,5b	15,2±0,2a	9,5±1,0c	13,4±1,7ab
Peso total da parte aérea (g)	63,1±0,9b	71,2±0,6a	62,9±4,6b	72,8±6,7a
Ganho peso de biomassa (g)	78,2±0,6b	85,2±0,6a	72,5±4,0b	85,6±4,6a
Máteria seca folha (%)	12,5±0,5a	13,4±0,3a	13,9±2,7 a	13,9±1,1a
Máteria seca raiz (%)	14,8±0,3a	11,7±0,3b	11,7±0,8b	13,8±0,5a
Matéria mineral folha (%)	82,9±0,8ab	82,6±0,5bc	81,9±0,8c	83,6±0,5a
Matéria mineral raiz (%)	50±1,1b	58,2±1,1a	62,6±4,6a	64,5±7,5a

Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre os controles e os tratamentos submetidos à suplementação com solução de ferro (T1Fe e T2Fe).

Os resultados relacionados à altura da planta mostram que os tratamentos T1Fe e T2Fe diferiram significativamente ($p < 0.05$) dos controles C1 e C2.

O peso total da raiz apresentou os melhores resultados com o tratamento controle C2 e T2Fe, sendo C2 significativamente diferente ($p < 0.05$) de C1 e T2Fe; o mesmo comportamento foi observado em relação ao peso total da parte aérea e ao ganho de peso de biomassa.

A massa seca da raiz entre os tratamentos, C1 e T2Fe foram estatisticamente

diferentes ($p < 0.05$) dos demais. As maiores médias foram encontradas nos tratamentos C1 e T2Fe.

A porcentagem de matéria mineral das folhas após o período experimental demonstrou uma diferença significativa entre os tratamentos, sendo as maiores médias encontradas nos tratamentos C1 e T2Fe. Quando analisamos os resultados referentes à matéria mineral da raiz, foi encontrada uma diferença estatística ($p < 0.05$) apenas no tratamento controle C1.

Não encontramos diferenças estatísticas entre os demais parâmetros avaliados: comprimento de raiz, número de folhas, distância entre nós, diâmetro do caule e matéria seca nas folhas nos tratamentos com soluções contendo Fe^{+2} (Tabela 5).

Os resultados obtidos nos tratamentos com Mn^{+2} estão apresentados na Tabela 6, e os mesmos parâmetros do experimento com Fe^{+2} foram analisados. Os resultados indicam que a altura da planta, o peso da raiz, peso total da parte aérea, ganho de peso de biomassa, matéria seca da raiz e matéria mineral da raiz, diferiram significativamente ($p < 0.05$) entre os tratamentos.

Tabela 6 Efeito dos isolados endofíticos do gênero *Aspergillus* nos parâmetros relacionados à promoção de crescimento de mudas de *A. grazielae*, 30 dias após a inoculação, suplementadas com solução de Mn^{+2} 300 mg.L⁻¹

Variáveis	Tratamentos			
	Controle sem Fungo (C1)	Controle com Fungo (C2)	Mn sem fungo (T1Mn)	Mn com fungo (T2Mn)
Comprimento da raiz (cm)	23±6,1a	22,7±4,6a	25±8,6a	20,5±6,3a
Número de folhas	10,8±1,1a	12±0,0 a	11±1,0a	10,9±1,5a
Distância ente nó (cm)	12,5±2,0a	11,6±2,8a	12,8±2,2a	11,3±2,4a
Diâmetro Caule (mm)	4,7±0,6a	4,5±0,6a	4,4±0,5a	4,9±0,6a
Altura da planta (cm)	37,1±1,4b	35±3,5b	40,9±3,3a	37,7±6,8a
Peso total da raiz (g)	12,8±0,5b	15,2±0,2a	9,9±1,3c	12,1±1b
Peso total da parte aérea (g)	63,1±0,9b	71,2±0,6a	61,8±4,9b	71,3±6,6b
Ganho peso de biomassa (g)	78,2±0,6b	85,2±0,6a	71,7±5,1b	84,4±7,4a
Máteria seca folha (%)	12,5±0,5a	13,4±0,3a	13,5±2,9a	13,5±1,6a
Máteria seca raiz (%)	14,8±0,3a	11,7±0,3b	11,5±1,9b	12,9±1,8a
Matéria mineral folha (%)	82,9±0,8a	82,6±0,5a	83,5±3,2a	82,3±2a
Matéria mineral raiz (%)	50±1,1b	58,2±1,1a	62,7±3,7a	58,5±4,4a

Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre os controles e os tratamentos submetidos à suplementação com solução de ferro (T1Mn e T2Mn).

No que se refere à altura da planta, os melhores resultados obtidos foram nos tratamentos T1Mn e T2Mn, sendo significativamente superiores aos controles C1 e C2.

Os valores das médias obtidas de peso total da raiz e da parte aérea apresentaram diferença entre os tratamentos, sendo que o tratamento C2 foi superior aos demais para estas variáveis. Comportamento semelhante foi obtido no ganho de peso de biomassa. Estes resultados indicam que a presença dos fungos no solo contribuiu para o ganho de biomassa das mudas de *A. grazielleae*.

Em relação à matéria seca da raiz, o tratamento controle C1 e T2Mn foram significativamente diferentes de C2 e T1Mn. Os resultados relacionados a matéria mineral da raiz indicam um comportamento idêntico aos tratamentos com Fe^{+2} , a presença dos isolados fúngicos e das regas com Mn^{+2} proporcionaram um acúmulo de matéria mineral nas raízes da planta.

Não verificamos influência dos fungos endofíticos no comportamento das mudas de *A. grazielleae* frente às variáveis comprimento de raiz, número de folhas, distância entre nós, diâmetro do caule, matéria seca da folha e na matéria mineral da folha.

Na Figura 4 apresentamos o enraizamento das mudas de *A. grazielleae* submetidas aos tratamentos controles com e sem os isolados no solo (Figura 5A e 5B) e os tratamentos com e sem os isolados no solo regados com solução de Fe^{+2} (Figura 5C e 5D) e Mn^{+2} (Figura 5E e 5F).



Figura 5. Enraizamento das mudas de *A. graziellae* em solo inoculado com os três isolados de *Aspergillus*, suplementadas com soluções de Fe^{+2} e Mn^{+2} 300 mg.L^{-1} , e tratamentos controle

Analisando o tratamento controle C2 (Figura 5B) com a presença dos isolados no solo, podemos observar que as raízes apresentaram maior desenvolvimento, quando comparadas com o tratamento controle C1 (Figura 5A), contribuindo para o maior ganho de peso. Comportamento semelhante pode ser observado entre os tratamentos T2 com isolados e tratados com solução de Fe^{+2} e o tratamento T1 com ausência dos isolados no solo e tratados com solução de Fe^{+2} (Figura 5D e 5C).

O tratamento com solução de Mn^{+2} T2 (Figura 5F) apresentou raízes curtas e mais ramificadas quando comparadas ao tratamento T1 (Figura 5E).

De acordo com os resultados obtidos para EPC, os tratamentos controles com e sem a presença dos isolados endofíticos e ausência das regas com metais, apresentaram um incremento significativo de 8,7% no ganho de peso de biomassa das mudas de *A. graziellae*, enquanto que os tratamentos com soluções de metais na presença e na ausência dos isolados levaram a um aumento de 18,1% e 16,3% de ganho de peso de biomassa para as regas com Fe^{+2} e Mn^{+2} , respectivamente.

Discussão

Há um número crescente de evidências que indicam a importância dos fungos endofíticos no crescimento e adaptação das plantas ao ambiente. Sua existência e abundância foram reconhecidas há muito tempo, mas apenas recentemente, sua capacidade de acelerar o crescimento das plantas e proteger-las contra uma ampla variedade de fatores de estresse tem ganhado a atenção da comunidade científica (Kanchiswamy et al. 2015; Kauppinen et al. 2016; Rho et al. 2017).

Neste estudo, das 17 mosfoespécies endofíticas isoladas, cinco cresceram em todas as concentrações de metais testadas, indicando a tolerâncias destas cepas endofíticas a determinadas concentrações de metais, um atributo importante para a sobrevivência de plantas em áreas impactadas por metais pesados (Zheng et al. 2015). Existem relatos do aumento da biomassa de plantas em sistemas contaminados com metais tóxicos (Deng et al. 2011; Li et al. 2012; Shen et al. 2013; Xu et al. 2015; Zhao et al. 2015).

Fungos resistentes ou tolerantes a metais pesados possuem diferentes mecanismos fisiológicos e bioquímicos controlados por diferentes genes de resistência que atuam intracelular e extracelularmente para neutralizar sua toxicidade ou até mesmo compartimentalizar o metal pesado (Zhao et al. 2015).

De acordo com o teste realizado para avaliar o índice de tolerância aos metais, três mosfoespécies endofíticas apresentaram bons resultados, e foram utilizadas para os testes em vasos com as mudas de *A. grazielae*. Os fungos endofíticos foram identificados como *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus sp11*, com base nas características morfológicas e na sequência das regiões ITS e β _tubulina, que são usados como uma ferramenta para identificação de fungos (Ghimire et al. 2011; Khan et al. 2015).

Segundo Heo et al. (2019), o gênero *Aspergillus* apresenta uma abundância relativamente alta quando comparado aos demais gêneros, justificando os resultados encontrados neste trabalho, onde observou-se alta frequência desde gênero tanto nas folhas como nas raízes das plantas de *A. graziellae*.

Os endófitos representam uma opção ecológica para a promoção de crescimento de plantas e diferentes espécies de *Aspergillus* têm demonstrado o potencial deste grupo no crescimento vegetativo e na produção de metabólitos secundários biologicamente ativos como alcaloides, terpenóides, esteroides, quinonas, derivados de isocumarina, flavanóides, fenóis, ácidos fenólicos e peptídeos (Li et al., 2018; Zhao et al. 2010; Islam et al. 2013; Lubna et al. 2018; Khare et al. 2018; Yoo et al. 2018).

Entre os mecanismos envolvidos no crescimento de plantas, podemos destacar as moléculas de sideróforos que estão envolvidas no processo de quelação de ferro e que podem interagir com metais pesados, influenciando a mobilidade e absorção destes metais pela planta (Rajkumar et al. 2010; Karimzadeh et al. 2012).

A sobrevivência dos isolados no meio sólido na presença dos metais e o aumento significativo de alguns dos parâmetros mensurados nas mudas de *A. graziellae*, indicam uma possível atuação dos sideróforos, podendo também ter relação ao local de coleta dos fungos endofíticos, pois a espécie vegetal está localizado junto a uma grande jazida de ferro e manganês.

Pesquisas utilizando fungos do gênero *Aspergillus* sp. como promotores de crescimento de plantas tem aumentado nos últimos anos, no entanto, não existe uma descrição detalhada dos mecanismos de ação, e preencher esta lacuna poderá auxiliar no aumento da produção agrícola e do nosso entendimento sobre as interações fungo-planta (Hung et al. 2016).

As mudas de *A. graziellae* inoculadas com os isolados de *Aspergillus*, suplementadas com solução de Fe^{+2} apresentaram aumento da altura, do peso da raiz e da parte aérea, no ganho de biomassa e na matéria mineral das folhas e raízes, enquanto que as plantas suplementadas com Mn^{+2} apresentaram aumento de altura, do peso da parte aérea, do ganho de biomassa e na matéria mineral das raízes. A presença dos isolados no solo onde as mudas de *A. graziellae* foram cultivadas proporcionou uma maior assimilação dos nutrientes disponíveis no solo. A concentração de 300 mg.L^{-1} de Fe^{+2} e Mn^{+2} não apresentou sinais de toxicidade para as mudas.

Estudos realizados com diferentes espécies vegetais têm demonstrado que outros gêneros de fungos endofíticos, além do *Aspergillus* são capazes de aumentar significativamente o crescimento das plantas. Essas contribuições são claramente observadas neste estudo, onde houve um maior progresso no desenvolvimento das mudas de *A. graziellae*. Segundo Pandya & Saraf (2010) a utilização dos gêneros *Penicillium* sp. (S12B) e *Aspergillus* sp. (S11) proporcionou um aumento significativo no crescimento das plantas, quando comparados com outros isolados.

Yadav et al. (2011) investigaram a atividade promotora de crescimento em plantas por fungos e moléculas de sideróforos produzidas por *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* e *Trichoderma harzianum*, e constataram aumento no comprimento da parte aérea e das raízes do grão de bico (*Cicer arietinum*), enquanto Pandya et al. (2018) observaram um aumento nos valores médios da altura de plantas de grão-de-bico e arroz após inoculação de um isolado de *Aspergillus* sp. NFP7. Yoo et al. (2018) obtiveram resultados positivos em plantas de tomate após a inoculação de *A. terreus* JF27 nas sementes, enquanto que Patel et al. (2017) inocularam *A. niger*

PT1 e *A. parasiticus* PT6, duas espécies produtoras de sideróforos, em plantas de feijão mungo e obtiveram aumento do crescimento vegetativo.

Muitos fungos promotores de crescimento fornecem ferro às plantas por meio de sideróforos (Sharma et al. 2013), e algumas hipóteses possíveis para explicar a ação conjunta dos metais e dos isolados de *Aspergillus* no aumento do *fitness* das mudas de *A. grazielleae* pode ter relação com a produção desses sideróforos produzidos, além da capacidade de solubilização de fosfatos e da produção de fitormônios (Pandya et al. 2018), que auxiliam a planta durante condições normais e nas condições de estresse, como alta salinidade, seca e temperaturas extremas (Khan et al. 2013).

Outras estratégias encontradas pelas plantas para colonizar solos contendo altas concentrações de metais pesados tem relação com a forma de adaptação/evolução para ocupação destes nichos (Jambon et al. 2018). A ativação de genes capazes de codificar múltiplas vias enzimáticas, estão relacionadas ao processo de exclusão de metais, ou a mecanismos de tolerâncias que permitem o acúmulo do metal pela planta (Milner et al. 2014).

Uma maneira encontrada pelas plantas de *A. grazielleae* para sobreviverem na região do maciço do Urucum, pode ter sido o desenvolvimento de uma relação simbiótica com fungos tolerantes a metais pesados, influenciando sua ocupação nesta área de mineração. A inoculação do hospedeiro com cepas resistentes pode resultar no crescimento das plantas em ambientes contaminados por metais (Pietro-Souza et al. 2017). A presença de contaminantes, como metais pesados, são parâmetros importantes na estruturação da comunidade fúngica (De Beeck et al. 2015; Ban et al., 2015).

As características dos microrganismos rizosféricos resistentes a metais

pesados ou relacionadas a promoção do crescimento das plantas podem levar a estratégias ecologicamente corretas e econômicas para a recuperação de solos poluídos por metais pesados. A exploração de microrganismos endofíticos com resistência a metais também é importante para as plantas hospedeiras, pois fornece nutrientes e metabólitos, aumentando a biodisponibilidade do metal na rizosfera das plantas (Rajkumar et al. 2010). O aumento resultante na absorção de traços de metal pelas plantas deve aumentar a eficácia dos processos de fitoextração do solo contaminado. As várias vias metabólicas empregadas pelos endofíticos os tornam recursos valiosos para a biorremediação de poluentes e biotransformação de substâncias orgânicas (Stepniewska & Kuzniar 2013).

Conclusões

O presente estudo revelou a capacidade dos isolados de *Aspergillus* crescerem em meio de cultura contendo soluções de Fe^{+2} e Mn^{+2} , não apresentando toxicidade para o desenvolvimento das mudas de *A. graziellae*.

A presença dos isolados foi capaz de promover o crescimento vegetativo das mudas, podendo ser bioestimuladores de crescimento, podendo assim, serem utilizados para uma agricultura sustentável, reduzindo os efeitos nocivos de compostos químicos tóxicos.

Mais estudos são necessários para propor um método de preparação de uma bioformulação e revelar os mecanismos de promoção do crescimento das plantas pelos isolados de *Aspergillus spp* que através das metodologias de biologia molecular foram indentificados como *Aspergillus udagawae* e *Aspergillus niger*. *Aspergillus sp11* foi enviado novamente para sequenciamento.

Conclusão Geral

A abordagem pioneira deste trabalho para uma espécie endêmica em um sistema complexo e único como o Pantanal, é uma etapa para o reconhecimento da importância da preservação das áreas nativas deste valioso ecossistema. A região possui uma fonte substancial de comunidades endofíticas radiculares, que podem ser fundamentais para o sucesso de iniciativas de restauração de áreas antropizadas+.

O gênero *Aspergillus* se mostrou mais tolerante aos metais testados do que o gênero *Penicillium*. Contudo, para fins de biorremediação, os isolados de *Aspergillus* não foram tão eficientes na remoção dos metais em meio líquido quanto o gênero *Penicillium*.

O isolado do gênero *Penicillium* (CR1) performou como o mais eficiente para remoção de metais, principalmente de Fe^{+2} , dentre todos os isolados testados, indicando que o mesmo apresenta um alto potencial para biorremediação para este metal. Tais resultados sugerem potencial aplicabilidade desta cepa para a remediação de solos e de recursos hídricos, contaminados com este mineral.

Este estudo denota para a capacidade dos isolados de *Aspergillus* crescerem em meio de cultura contendo soluções de Fe^{+2} e Mn^{+2} , não apresentando toxicidade para o desenvolvimento das mudas de *A. graziellae*. A presença dos isolados no solo foi capaz de promover o crescimento vegetativo das plantas, e assim, sua utilização pode corroborar para uma agricultura sustentável e consequentemente reduzir os efeitos nocivos de compostos químicos tóxicos.

Para a utilização destes endofíticos em uma bioformulação, serão necessários estudos adicionais com definição de metodologias e melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento destes isolados do gênero *Aspergillus* da espécie vegetal *A. graziellae*.

Referências

- Abdel-Azeem, A.M.; Salem, F.M.; Abdel-Azeem, M.A.; Nafady, N.A.; Mohesien, M.T.; Soliman, E.A. Biodiversity of the Genus *Aspergillus* in Different Habitats. 2016. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. 3: 28, 2016. doi: 10.1016/b978-0-444-63505-1.00001-4
- Abhilash, P. C., Powell, J. R., Singh, H. B., & Singh, B. K. (2012). Plant–microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies. *Trends in Biotechnology*, 30(8), 416–420.
- Accioly, A. M. A.; Siqueira, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novais, R. F.; Alvarez V.; V. H.; Schaefer, C. E. G. R. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v. 1. p. 299-352.
- Aguilar-Trigueros CA, Rillig MC (2016) Effect of different root endophytic fungi on plant community structure in experimental microcosms. *Ecology and Evolution* 6(22): 8149- 8158. doi:10.1002/ece3.2416
- Ahmad, M., Pataczek, L., Hilger, T. H., Zahir, Z. A., Hussain, A., Rasche, F., ... Solberg, S. Ø. (2018). Perspectives of Microbial Inoculation for Sustainable Development and Environmental Management. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02992
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). *Siderophores in environmental research: roles and applications*. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. doi:10.1111/1751-7915.12117
- Akinsanya MA, Goh JK, Lim SP, Ting ASY (2015) Metagenomics study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. *Genomics Data* 6: 59-163. doi:10.1016/j.gdata.2015.09.004
- Al-Bulushi IM, Bani-Uraba MS, Guizani NS, Al-Khusaibi MK, Al-Sadi AM (2017) Illumina MiSeq sequencing analysis of fungal diversity in stored dates. *BMC Microbiology* 17(1): 72. doi:10.1186/s12866-017-0985-7
- Alexander, D. B.; Zuberer, D. A. Use of chrome azurol S reagentes to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and fertility of soils*, v. 12, p. 39-45, 1991.
- Alho CJR (2008) Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. *Brazilian Journal of Biology* 68(4 suppl): 957-966. doi:10.1590/s1519-69842008000500005
- Alho CJR, Silva JSV (2012) Effects of Severe Floods and Droughts on Wildlife of the Pantanal Wetland (Brazil) - Review. *Animals* 2(4): 591- 610. doi.org/10.3390/ani2040591
- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere* 91:869-881.

Almoneafy, A. A., Kakar, K. U., Nawaz, Z., Li, B., saand, M. A., Chun-lan, Y., & Xie, G.-L.(2014). *Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial Bacillus strains against Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis*, 63(2), 59–70. doi:10.1007/s13199-014-0288-9

Anahid, S.; Yaghmaei, S.; Ghobadinejad, Z. Heavy. Metal Tolerance of Fungi. *Scientia Iranica*, V. 18, N. 3, P. 502-508, 2011.

Andrade, J. de A., Augusto, F., & Jardim, I. C. S. F. (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, 35(3), 17–43. doi:10.1590/s0100-46702010000300002

Andrew DR, Fitak RR, Munguia-Veja A, Racolta A, Martinson VG, Dontsova K (2012) Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran desert soils. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 7527-7537. doi:10.1128/aem.01459-12

Angelard, C. Colard, A. Niculita_hirzel, H. Croll, D. Sandres I. R. 2010. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. *Curr Biol* 20(13): 1216-1221. doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.031

Araujo WL, Maccheroni Jr W, Agualar-Wildoso CL, Barroso PAV, Saridakis HO, Azevedo JL (2001) Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 229-236. doi:10.1139/w00-146

Araujo, E. R., Olivieri, R. D., & Fernandes, F. R. C. (2014). Atividade mineradora gera riqueza e impactos negativos nas comunidades e no meio ambiente. CETEM/MCTI.

Araújo, J. F.O. et al. Atividade antibacteriana, citotóxica e cicatrizante in vitro de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais: *Mimosa Tenuiflora* (Willd.) Poir., *Poincianella Pyramidalis* Tul. e *Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. 2018.

Arnold A, Elizabeth F Lutzoni. 2007. Diversity And Host Range Of Foliar Fungal Endophytes: Are Tropical Leaves Biodiversity Hotspots? *Ecology* 88: 541-549.

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

Årstøl, E., & Hohmann-Marriott, M. F. (2019). Cyanobacterial Siderophores—Physiology, Structure, Biosynthesis, and Applications. *Marine Drugs*, 17(5), 281. doi:10.3390/md17050281

Ashraf MA, Maah MJ, Yusoff I. 2011. Heavy metals accumulation in plants growing in ex tin mining catchment. *International Journal of Environmental Science and Technology* 8: 401-416.

Azevedo, A.C.S.; Furlaneto, M.C.; Sosa-Gomez, D.R.; Fungaro, M.H.P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*)

isolates. *Scientia Agricola*, v. 57, p.729-732, 2000.

Aznar A, Dellagi A. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *J Exp Bot*. 2015; 66(11): 3001±3010. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv155> PMID: 25934986

Bacon CW & White JF. 2000. *Microbial endophytes*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

Baldrian P, Kolarík M, Stursová M, Kopecký J, Valasková V, Vetrovsky T, Zifcáková L, Snajdr J, Rídl J, Vlcek C, Vorísková J (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *International Society for Microbial Ecology* 6(2): 248-258. doi:10.1038/ismej.2011.95

Ban Y, Xu Z, Zhang H, Chen H, Tang M. Soil chemistry properties, translocation of heavy metals, and mycorrhizal fungi associated with six plant species growing on lead-zinc mine tailings. *Ann Microbiol*. 2015; 65(1): 503±515. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0886-z>

Barbosa, E. C. et al. Isolamento, identificação e avaliação das atividades enzimática e antibacteriana de microorganismos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. 2015.

Barnes CJ, Maldonado C, Frøslev TG, Antonelli A and Rønsted N (2016) Unexpectedly High Beta-Diversity of Root-Associated Fungal Communities in the Bolivian Andes. *Front. Microbiol* 7: 1377.

Barroso, C. B.; Nahas, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 29, p. 73-83, 2005.

Begum N, Qin C, Ahanger MA, Raza S, Khan MI, Ashraf M, Ahmed N, Zhang L (2019) Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front Plant Sci* 10:1068.

Bhargawa A, Carmona FF, Bhargava M, Srivastava S. 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management* 105: 103-120. *Biotechnology* 19(6): 560-565.

Bisht, S.; Pandey, P.; Bhargava, B.; Sharma, S.; Kumar, V.; Sharma, K.D. 2015. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Braz. J. Microbiol.* v. 46, n. 1, p. 7-21.

Blumer, S. A. G. Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2002. doi:10.11606/D.11.2002.tde-21112002-161816. Acesso em: 2018-11-11

Bordean, D. M.; Nica, D.V.; Harmanescu, M.; Banatean-Dunea, I.; Gergen, I. I. Soil manganese enrichment from industrial inputs: a gastropod perspective. *PloS one*, v. 9, n. 1, 2014.

Bortolloto IM, Damasceno-Júnior GA, Pott A (2015) Lista preliminar das plantas alimentícias nativas de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia Série Botânica* 73(supl.): 101-106.

Bortolotto I.M., Damasceno Junior, G.A. & Isquierdo, S.W.G. Caracterização das unidades fitofisionômicas da bacia da lagoa Negra em Ladário, MS. Pp. 283-289. In: *Anais do II Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal: manejo e conservação*. Corumbá 1996. Embrapa – Pantanal. Corumbá. 1999.

Bragina A, Oberauner-Wappis L, Zachow C, Halwachs B, Thallinger GG, Müller H, Berg G (2014) The *Sphagnum* microbiome supports bog ecosystem functioning under extreme conditions. *Molecular Ecology* 23(18): 4498-4510. doi:10.1111/mec.12885

Brasil. Portaria n. 443, de 17 de dezembro 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção, Brasília, DF, Maio 2018. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/cepsul/legislacao/portaria/427-2014.html>>. Acesso em: 12 maio 2018.

Brunelli K.R.; Fazza A.C.; Athayde, S.C.; Camargo L.E.A. 2006. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zeae-maydis*. *Summa Phytopathol* 32: 92-94.

Cannon PF. 1997. Strategies for rapid assessment of fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 6: 669-680.

Cardinale M (2014) Scanning a microhabitat: plant-microbe interactions revealed by confocal laser microscopy. *Front. Microbiol* 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00094

Chalmardi, Z.K., Abdolzadeh, A. & Sadeghipour, H.R. Silicon nutrition potentiates the antioxidant metabolism of rice plants under iron toxicity. *Acta Physiol Plant* 36, 493–502, 2014.

Chapla, V.M.; Biasetto, C.R.; Araujo, A.R. 2013. Endophytic Fungi: An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products. *Revista Virtual Química* 5 (3): 421-437.

Cicatiello P, Gravagnuolo AM, Gnani G, Varese GC, Giardina P (2016) Marine fungi as source of new hydrophobins. *Int J Biol Macromolec* 92:1229-1233.

Clarke BB, White Jr JF, Hurley RH, Torres MS, Sun S, Huff DR. 2006. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease* 90: 994–998.

Clay K. (1988) Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69, 10-16.

Clay, K. and Holah, J. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, 285, 1742-1744.

CNCFlora - Centro Nacional de Conservação da Flora (2015) Projeto Lista Vermelha. <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/ptbr/projetos/lista-vermelha>. Accessed 10 August 2018.

Collins, Y. E.; Stotzky, G. Heavy metal alter the electrokinetic properties of bacteria, yeast and clay minerals. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v. 58, n. 5, p. 1592-1600, May 1992.

Correia, A. M. L., Lira, S. P., Assis, M. A., & Rodrigues, A. (2017). Fungal Endophyte Communities in Begonia Species from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Current Microbiology*, 75(4), 441–449. doi:10.1007/s00284-017-1400-1

Costa, M. R.M., Figueiredo, R.C. *Balanço Mineral Brasileiro*, 2001.

Cox F, Barsoum N, Lilleskov EA, Martin I, Bidartondo MI (2010) Nitrogen availability is a primary determinant of conifer mycorrhizas across complex environmental gradients. *Ecology Letters* 13: 1103-1113. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01494.x

Crawford KM, Land JM, Rudgers JÁ. 2010. Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. *Oecologia* 164(2): 431–444.

Cross AT, Stevens JC, Dixon KW (2017) One giant leap for mankind: can ecopoiesis avert mine tailings disasters? *Plant and Soil* 421(1-2): 1-5. doi:10.1007/s11104-017-3410-y

Dalmau LM (1929) Observations on mycological technique with particular reference to pathogenic fungi. *Porto Rico Journal of Public and Health and Tropical Medicine* 5: 302-311.

Datta B. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from metal-contaminated soil. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci*. 2015;17(4):965–968.

De Beeck MO, Ruytinx J, Smits MM, Vangronsveld J, Colpaert JV, Rineau F. Belowground fungal communities in pioneer Scots pine stands growing on heavy metal polluted and non-polluted soils. *Soil Biol Biochem*. 2015; 86: 58±66. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.007>

De Lima D. P, Dos Santos, E. A, Marques M. R, Giannesi G. C, Beatriz, Adilson; Yonekawa M. K. A, Montanholi A. S. 2018. Fungal bioremediation of pollutant aromatic amines. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 11, p. 34-44, 2018.

Dechen, A. R.; Nachtaigall, G. R. Micronutrientes. In: Fernandes, M.S. (Ed.). *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.327-354.

Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, et al. Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapeseed (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. *J Hazard Mater*. 2011; 185(2): 717-724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.078> PMID: 20956060

Deng Z, Zhang R, Shi Y, Tan H, Cao L. Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic *Lasiodiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rapeseed in metal-contaminated soils. *Env Sci Pollut Res*. 2014; 21(3): 2346-2357. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2163-2> PMID: 24062066

Deshmukh R, Khardenavis AA, Purohit HJ (2016) Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian J Microbiol* 56:247-264.

Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T. 1993. *Compendium of soil fungi*. San Francisco, IHW – Verlag.

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

Ezzouhri, L; Castro, E; Moya, M; Espinola, F and Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 3 (2) pp. 035-048.

Farias, Y. P. T. M. M. Aplicação de microorganismos na remediação de áreas contaminadas por metais pesados. 2008.

Farinaccio MA, Roque FO, Graciolli G, Souza PR, Pinto JOP (2018) A flora no Biota-MS: montando o quebra-cabeça da biodiversidade de Mato Grosso do Sul - Iheringia, *Série Botânica* 73(supl.): 11-17. doi: [10.1007/s11104-015-2745-5](https://doi.org/10.1007/s11104-015-2745-5)

Farr DF, Rossman AY (2017) *Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA*. Retrieved January 10, from <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>

Faucon MP, Le Stradic S, Boisson S, El w I, Séleck M, Lange B, Guillaume D, MNS, Pourret O, Meerts P, Mahy G (2016) Implication of plant-soil relationships for conservation and restoration of copper-cobalt ecosystems. *Plant & Soil* 403: 153-165. doi: [10.1007/s11104-015-2745-5](https://doi.org/10.1007/s11104-015-2745-5)

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil.

Ferreira, M. J., Silva, H., & Cunha, A. (2019). Siderophore-Producing Rhizobacteria as a Promising Tool for Empowering Plants to Cope with Iron Limitation in Saline Soils: A Review. *Pedosphere*, 29(4), 409-420. doi:10.1016/s1002-0160(19)60810-6

Fink, J. R., Inda, A. V., Tiecher, T., & Barrón, V. (2016). Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(4), 369-

379. doi:10.1590/1413-70542016404023016

Flora de Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Avalia-lhe in: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Accessed on 07 June 2019.

Fujimura KE, Egger KN (2012) Host plant and environment influence community assembly of High Arctic root-associated fungal communities. *Fungal Ecology* 5(4): 409-418. doi: [10.1016/j.funeco.2011.12.010](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.010)

Galvão ML, de Siqueira KA, da Cunha KN, Soares MA (2014) Associação entre fungos e sistema radicular de plantas do Pantanal mato-grossense. *Global. Science and Technology* 07(2): 56-62. doi:10.14688/1984-3801/gst.v7n2p56-62

Gange AC, Eschen R, Wearn JA, Thawer A, Sutton BC. 2012. Differential effects of foliar endophytic fungi on insect herbivores attacking a herbaceous plant. *Oecologia* 168(4): 1023–1031.

Gazis R, Chaverri P (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology* 3: 240-254. Doi: 10.1016/j.funeco.2009.12.001

Ghimire SR, Charlton ND, Bell JD, Krishnamurthy YL, Craven KD (2011) Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. *Fungal*

Glass NL, Donaldson GC (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.

Glick, B. R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28: 367–74.

Glienke-Blanco C.; Aguilar-Vildoso C. I.; Vieira M. L. C; Barroso P. A. V; Azevedo J. L. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genet Mol Biol* 25: 251-255.

Gomes, O. F. M. Caracterização tecnológica de minério de ferro especularítico. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Gos FMWR, Savi DC, Shaaban KA, Thorson JS, Aluizio R, Possiede YM, Rohr J, Glienke C (2017) Antibacterial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from the Medicinal Plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Front. Microbiol.* 8: 1642. doi:[10.3389/fmicb.2017.01642](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01642)

Graciolli G, Roque FO, Farinaccio MA, de Souza PR, Pinto JOP (2017) Biota-MS: Montando o quebra-cabeça da biodiversidade de Mato Grosso do Sul. *Iheringia Série Zoologia* 107: e2017100. doi:doi.org/10.1590/1678-4766e2017100.

Griffin, D. H. 1993. *Fungal Physiology*. 2nd Edition. Wiley-Liss Inc, New York.

Grimm, P. W. Allen, P. J. Promotion by zinc of the formation of cytochromes in *Ustilago phaeogenes*. *Plant Physiology*, v. 29, 369-377, 1954.

Grube M, Cernava T, Soh J, Fuchs S, Aschenbrenner I, Lassek C, Wegner U, Becher D, Riedel K, Sensen CW, Berg G (2015) Exploring functional contexts of symbiotic partners within lichen associated bacteria by comparative omics. *ISME J*. 9: 412-424.

Günther M (2017) Fungal glycolipids as biosurfactants. *Curr Biotechnol* 5:1-13.

Gupta, N., Yadav, K. K., Kumar, V., Kumar, S., Chadd, R. P., & Kumar, A. (2018). Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.047

Haigh M. Impacts of Reclaimed Opencast Coal-Land on Headwater Ecosystem Services. In: Křeček J., Haigh M., Hofer T., Kubin E., Promper C. (eds) *Ecosystem Services of Headwater Catchments*. Springer, Cham. pp 183-205, 2017.

Hamayun M, Khan SA, Kim HY, Chaudhary MF, Hwang YH, Shin DH, Kim IK, Lee BH, Lee IJ. 2009. Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. *Journal of Microbiology and*

Haralyi NLE, Walde DHG (1986) Os minerais de ferro e manganês da região de Urucum, Corumbá, Mato Grosso do Sul. In: Schobbenhaus CC. *Principais depósitos minerais do Brasil*. Brasília 2: 127-144.

Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79(3): 293-320. doi:10.1128/mmlr.00050-14

Haselwandter, K. (2008). Structure and function of siderophores produced by mycorrhizal fungi. *Mineralogical Magazine*, 72(01), 61-64. doi:10.1180/minmag.2008.072.1.61

Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC and Pegler DN (1995) *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 8. ed. Wallingford: CAB international.

Heo, I., Hong, K., Yang, H., Lee, H. B., Choi, Y.-J., & Hong, S.-B. (2019). Diversity of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* Species Isolated from Freshwater Environments in Korea. *Mycobiology*, 47(1), 12–19. doi:10.1080/12298093.2019.1572262

Herrera, S. D.; Grossia, C.; Zawoznika, M.; Gropp, M.D. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, 186-187: 37-43, 2016.

Hider RC e Kong X (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27: 637-657.

Hind DJN, Miranda EB (2008) Lista preliminar da família Compositae na Região Nordeste do Brasil. Royal Botanic Gardens, Kew.

Hipol RM, Baldelomar JA, Bolinget KC and Solis AFF. The soil fungi producing siderophores of Mt. Yangbew, Tawang, La Trinidad, Benguet. *Studies in Fungi* 4(1): 1–13, 2019.

Ho, HL and Hood, JS (2014) Optimisation of Medium Formulation and Growth Conditions for Xylanase Production by *Aspergillus brasiliensis* in Submerged Fermentation (SmF). *J Biodivers Biopros Dev* 1: 102. doi:10.4172/2376-0214.1000102

Howe, P. D.; Malcolm, H., Dobson, S. Manganese and its compounds: environmental aspects. World Health Organization, Geneva, 2005, 70p.

Hung, R., & Lee Rutgers, S. (2016). Applications of *Aspergillus* in Plant Growth Promotion. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, 223–227. doi:10.1016/b978-0-444-63505-1.00018-x

Igiri, B.E.; Okoduwa, S.I.R.; Idoko, G.O.; Akabuogu, E.P.; Adeyi, A.O.; Ejiogu, I.K. 2018. Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review.

Ignatova LV, Brazhnikova YV, Mukasheva TD, Omirbekova AA, Berzhanova RZh, Sydykbekova RK, Karpenyuk TA, Goncharova AV. 2013. Biodiversity of Micromycetes Isolated from Soils of Different Agricultures in Kazakhstan and Their Plant Growth Promoting Potential. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* 7(2).

Ikram, M., Ali, N., Jan, G., Guljan, F., & Khan, N. (2019). Endophytic fungal diversity and their interaction with plants for agriculture sustainability under stressful condition. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 10. doi:10.2174/2212798410666190612130139

İnceoğlu O, Salles JF, Van Elsas JD (2012) Soil and cultivar type shape the bacterial community in the potato rhizosphere. *Microbial Ecology* 63: 460-470.

Ioca, L. P.; Allard, P.; Berlinck, R. G. S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. *Natural Product Reports*, v. 31, p. 646–675, 2014.

Iram, S., A. Iftikhar., J. Barira and Y. Saeeda. 2009. Fungal tolerance to heavy metals. *Pakistan Journal of Botany* 41(5): 2583-2594.

Islam, S., Akanda, A. M., Sultana, F., & Hossain, M. M. (2013). Chilli rhizosphere fungus *Aspergillus* spp. PPA1 promotes vegetative growth of cucumber (*Cucumis sativus*) plants upon root colonisation. *Archives of Phytopathology And Plant Protection*, 47(10), 1231–1238. doi:10.1080/03235408.2013.837633

Jacques RJS, Silva KJ da, Bento FM, Camargo FAO. 2010. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciência Rural* 40(2): 280-287.

Jaklitsch WM, Voglmayr H. *Hypocrea brittdaniae* and *H. foliicola*: two remarkable new European species. *Mycologia*. 2012; 105:1213–1221.doi.org/10.3852/11-429

Jambon, I, Thijs, S, Weyens, N, & Vangronsveld, J (2018). Harnessing plant-bacteria-fungi interactions to improve plant growth and degradation of organic pollutants. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 119–130. [doi:10.1080/17429145.2018.1441450](https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1441450)

Jamil, M., Ahamd, M., Anwar, F., Zahir, Z. A., Kharal, M. A., and Nazli, F. (2018). Inducing drought tolerance in wheat through combined use of L-tryptophan and *Pseudomonas fluorescens*. *Pak. J. Agri. Sci.* 55, 331–337. [doi: 10.21162/PAKJAS/18.4980](https://doi.org/10.21162/PAKJAS/18.4980)

Jia, M.; Chen, L.; Xin, H.; Zheng, C.; Rahman, K.; Han, T. A Friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1–14, 2016.

Jingy, H. E. Z.; Yang, X. 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science* 8: 192–207.

Johnson L. Iron and siderophores in fungal–hostinteractions. *Mycol Res.* 2008; 112:170–183.59.

Jorgenson, K. D.; Lee, P. F.; Kanavillil, N. 2013. Ecological relationships of wild rice, *Zizania* spp. 11. Electron microscopy study of iron plaques on the roots of northern wild rice (*Zizania Palustris*). *Botany* **91**: 189–201.

Joseph B.; Priya R. M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect: A Review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. v. 1, n. 3, p. 291-309, 2011.

Judd WS, Campbel CS, Kellongg EA, Steens PF, Donogue MJ. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 612p.

Junk WJ, Bayley PB, Sparks RE (1989) The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 106: 110-127.

Junk WJ, da Cunha CN, Wantzen KM, Petermann P, Strüssmann C, Marques MI, Adis J (2006) Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences* 68(3): 278- 309. [doi:10.1007/s00027-006-0851-4](https://doi.org/10.1007/s00027-006-0851-4)

Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E., 2015. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci.* 6. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>.

Kang, B. G., Kim, W. T., Yun, H. S., and Chang, S. C. (2010). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnol. Rep.* 4, 179–183. doi: 10.1007/s11816-010-0136-1

Karimzadeh L, Heilmeyer H, Merkel BJ. Effect of microbial siderophore DFO-B on Cd accumulation by *Thlaspi caerulescens* hyperaccumulator in the presence of zeolite. *Chemosphere.* 2012; 88(6): 683±687. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.075> PMID: 22572166

Kauppinen, M., Saikkonen, K., Helander, M., Pirttilä, A.M., Wäli, P.M., 2016. Epichloë grass endophytes in sustainable agriculture. *Nat. Plants* 2, 15224. <http://dx.doi.org/10.1038/nplants.2015.224>.

Kernaghan, G., Widden, P., Bergeron, Y., Legare, S., & Pare, D. (2003). Biotic and abiotic factors affecting ectomycorrhizal diversity in boreal mixed-woods. *Oikos*, 102(3), 497–504. doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12415.x

Khalid, A., Akhtar, M. J., Mahmood, M. H., and Arshad, M. (2006). Effect of substrate-dependent microbial ethylene production on plant growth. *Microbiology* 75, 231–236. doi: 10.1134/S0026261706020196

Khan AL, Hamayun M, Ahmad N, Hussain J, Kang SM, Kim YH, Adnan M, Tang DS, Waqas M, Radhakrishnan R, Hwang YH, Lee IJ. 2011. Salinity Stress Resistance Offered by Endophytic Fungal Interaction Between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max.* L. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 893-902.

Khan AL, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Jung HY, Lee JH, Lee IJ. 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology* 12: 1-14.

Khan AR, Ullah I, Waqas M, Park GS, Khan AL, Hong SJ, ...Shin JH (2017) Host plant growth promotion and cadmium detoxification in *Solanum nigrum*, mediated by endophytic fungi. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 136: 180-188. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.03.014.

Khan AR, Waqas M, Ullah I, Khan AL, Khan MA, Lee IJ, et al. Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. *Environ Exp Bot.* 2017; 135: 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.03.005>

Khan, A. L., Waqas, M., Khan, A. R., et al., “Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 improves growth of ABAdeficient tomato under salinity” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 29, no. 11, pp. 2133–2144, 2013.

Khan, A.; Singh, P.; Srivastava, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research*, v. 212-213, p. 103-111, 2017.

Khan AL, Hussain J, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Lee I-J (2015)

Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Crit Rev Biotechnol* 35(1):62–74. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.800018>

Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., Ahemad, M., and Oves, M. (2009a). “Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: current status,” in *Microbial Strategies for Crop Improvement*, eds M. Khan, A. Zaidi, and J. Musarrat (Berlin; Heidelberg: Springer), 105–132.

Khare E, Mishra J, Arora NK. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front Microbiol.* 2018;9:2732. Published 2018 Nov 15. doi:10.3389/fmicb.2018.02732

Kivlin SN, Hawkes CV (2016) Temporal and spatial variation of soil bacteria richness, composition, and function in a neotropical rainforest. *PLoS ONE* 11(7): e0159131. doi:[10.1371/journal.pone.0159131](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159131)

Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology* 19: 792-798.

Lamoso, L. P. A Exploração Mineral no Estado de Mato Grosso do Sul - Brasil, 2001.

Lamoso, L. P. Exploração de Minério de Ferro no Brasil e no Mato Grosso do Sul. Paco Editorial, 2015.

Lemos, J. L. S.; Santos, R. L. C. Aplicação de microrganismos na recuperação de metais. 2007.

Li H, Li D, He C, Zhou Z, Mei T, Xu H. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb e Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecol.* 2012; 5(3): 309±315. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.06.002>

Li, S.J., Zhang, X., Wang, X.H., & Zhao, C.Q. (2018). Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 316–343. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.07.015

Linnakoski, R.; Puhakka, H.; Pappinen, A. 2011. Endophytic fungi isolated from *Khaya anthothecain* Ghana. *Fungal Ecology* 3(12): 444-453.

Lopes, J. C.; Junior, A. F. C.; Neves, A. C. C.; Chapla, V. M.; Batistella, C. A. R. Fungos endofíticos isolados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatógenos. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v. 7, n. 3, p. 84-88, 2017.

Lu D, Jin H, Yang X, Zhang D, Yan Z, Li X, Zhao Y, Han R, Qin B (2016) Characterization of rhizosphere and endophytic fungal communities from roots of *Stipa purpurea* in alpine steppe around Qinghai Lake. *Canadian Journal of Microbiology* 62(8): 643-656. doi:[10.1139/cjm-2015-0857](https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0857)

- Lubna AS, Hamayun M, Gul H, Lee IJ, Hussain A (2018) *Aspergillus niger* CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. *J Plant Interact* 13:100–111
- Ma, Y.; Rajkumar, M.; Luo, Y.; Freitas, H. 2011. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants: effects on plant growth and Ni uptake. *Journal of Hazardous Materials* 195: 230-237.
- Machado, A. A.; Izumi, C.; Freitas, O. Bases moleculares de absorção de ferro. *Alimentos e Nutrição*. V. 16, n. 3, p. 293-298, 2005.
- Marques M, Aguiar CRC, Silva JLS. 2011. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35(1): 643-652.
- Marschner, H. Mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. London: Academic Press, 2012. 615p.
- Martin, F. M., Uroz, S., & Barker, D. G. (2017). Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science*, 356(6340), eaad4501. doi:10.1126/science.aad4501
- Maurer, B.A. 2009. Spatial patterns of species diversity in terrestrial environments. In: S.A. Levin (ed.). *The Princeton Guide to Ecology*. Princeton University Press, New Jersey, Princeton, pp. 464-473.
- McGrath, S. W.; Zhao, F. J.; Lombi, E. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal- contaminated soils. *Plant and Soil*, v. 232, p. 207-214, 2001.
- Mechi, A.; Sanches, D. L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. *Estud. av.*, São Paulo, v. 24, n. 68, p. 209-220, 2010.
- Melo, A. Princípios norteadores da gestão dos recursos hídricos no Brasil e no Estado de São Paulo em tempo de escassez. In: Giometti, A. B. R.; David, C. M. Um descortinar sobre o patrimônio e desenvolvimento sustentável, no século XXI – Volume I. Curitiba: CRV, 2016.
- Mendes Filho PF, Vasconcellos RLF, Paula AM, Cardoso EJBN. 2010. Evaluating the potential of forest species under microbial management of the restoration of degraded mining areas. *Water, Air and Soil Pollution* 208(1/4): 79-89.
- Mendes R, Raaijmakers JM (2015) Cross-kingdom similarities in microbiome functions. *The ISME Journal*. 9(9):1905-1907. doi:[10.1038/ismej.2015.7](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.7).
- Milner MJ, Piñeros M, Kochian L V. Molecular and physiological mechanisms of plant tolerance to toxic metals. In: Jenks MA, Hasegawa PM, editors. *Plant Abiotic Stress*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2014. pp. 179±201.

Mishra Y, Singh A, Batra A, Sharma MM. 2014. Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. *J Microb Biochem Technol* S8: 004.

Morsy, M. R., J. Oswald, J. He, Y. Tang, And M. J. Roossinck. 2010. Teasing apart a three-way symbiosis: Transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401: 225–230.

Moura, A. J. et al. Microorganismos endofíticos associados à planta de ambientes impactados e não impactados pela drenagem ácida de mina de carvão (DAM). 2014.

Mueller JG, Cerniglia CE, Pritchard PH. 1996. Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *In* *Bioremediation: Principles and Applications*: 125–194, Cambridge University Press, Cambridge.

Naidoo G.; Chirkoot H. D. 2004. The effects of coal dust on photosynthetic performance of the mangrove *Avicennia marina* in Richards Bay, South Africa. *Environmental Pollution* 127: 359-366.

Nardis, B. O. Crescimento de cinco forrageiras gramíneas em solo contaminado com manganês. 2012. 15 f. Monografia (Graduação em Agronomia) –Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

Neilands, J. B. Microbial iron compounds *Annual Review of Biochemistry*, v. 50, p. 715-731, 1981.

Neirotti, E.; Azevedo, I. L. Técnicas semi quantitativas de avaliação de produção de celulase em *Humicola* sp. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.19, p.78-81, 1988.

Nevitt, T. War-Fe-re: Iron at the core of fungal virulence and host immunity. *Biometals*. V. 24, n. 3, p. 547-558, 2011.

Nilsson RH, Larsson KH, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, Kennedy P, Picard K, Glockner FO, Tedersoo L, Saar I, Koljalg U, Abarenkov K (2019) The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research* 47. doi:[10.1093/nar/gky1022](https://doi.org/10.1093/nar/gky1022)

Nisa H, Kamili AN, Nawchoo IA, Shafi S, Shameem N, Bandh AS (2015) Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis* 82: 50-59. doi:[10.1016/j.micpath.2015.04.001](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.04.001)

Noriler AS, Savi DC, Aluizio R, Palácio-Cortez AM, Possiede YM, Glienke C (2018) Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, Pantanal and Cerrado. *Frontiers. Microbiology* 9: 1526. doi:[10.3389/fmicb.2018.01526](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01526)

Nutaratat P, Srisuk N, Arunrattiyakorn P, Limtong S. 2014. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biology* 118(8): 683-694.

Ojuederie, O.B. and Babalola, O.O. 2017. Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14: 1504.

Oladipo, O.G.; Awotoye, O. O.; Akinyemi Olayinkac, Bezuidenhout, C.C.; Maboetaa, M.S. 2018. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining Brazilian journal of microbiology 4 9: 29-37.

Olicón-Hernández DR, González-López J, Aranda E (2017) Overview on the Biochemical Potential of Filamentous Fungi to Degrade Pharmaceutical Compounds. *Front Microbiol* 8:1792.

Oliveira, F. J.; França A, F. P. de Increase in removal of polycyclic aromatic hydrocarbons during bioremediation of crude oil-contaminated sandy soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.121/124, p.593-603, 2005.

Omacini M, Chaneton EJ, Ghera CM, Mueller CB (2001) Symbiotic fungal endophytes control insect host–parasite interaction webs. *Nature* 409:78–81

Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113-128.

Ozment, C. P.; Turi, J. L. Iron overload following red blood cell transfusion and its impact on disease severity. *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1790, n. 7, p. 694-701, 2009.

Pandya, N. D., Desai, P. V., Jadhav, H. P., & Sayyed, R. Z. (2018). Plant growth promoting potential of *Aspergillus* sp. NPF7, isolated from wheat rhizosphere in South Gujarat, India. *Environmental Sustainability*. doi:10.1007/s42398-018-0025-z

Pandya, U., and Saraf, M. Role of Single Fungal Isolates and Consortia as Plant Growth Promoters under Saline Conditions. *Research Journal of Biotechnology*. 2010. 5 (3) 5-9.

Parks DH, Beiko RG (2010) Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* 26(6): 715-721. doi: [10.1093/bioinformatics/btq041](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq041)

Parpinelli B, Siqueira K, Kellner Filho L, Pimenta L, da Costa R, Parreira R, Januario A (2017) Effect of Endophytic Fungal Associations on the Chemical Profile of in vitro *Vochysia divergens* Seedlings. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 28(12): 2375-2381. doi: [10.21577/0103-5053.20170091](https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170091)

Patel, D., Patel, S., Thakar, P., Saraf, M. 2017. Siderophore Producing *Aspergillus* spp as Bioinoculant for Enhanced Growth of Mung Bean. *International Journal of Advanced Agricultural Sciences and Technology* 6: 111-120.

Peay KG, Kennedy PG, Talbot JM (2016) Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7): 434-447. doi: [10.1038/nrmicro.2016.59](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59)

Pereira JO, Azevedo JL, Petrini O (1993) Endophytic fungi of *Stylosanthes*. *Mycologia* 85: 362-364.

Pereira, A. A. S.; Costa, D. A. T.; Borges, L. A. C. Percepção ambiental de pós-graduandos sobre os impactos da mineração Percepción ambiental de post-graduandos sobre los impactos de la minería Environmental perception of post-graduants on the impacts of mining. REMEA-Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental, v. 34, n. 2, p. 238-255, 2017.

Peršoh, D (2015) Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. *Fungal Diversity* 75(1): 1-25. doi: [10.1007/s13225-015-0334-9](https://doi.org/10.1007/s13225-015-0334-9)

Petrini O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues, p 175–187. In Fokkema NJ, van den Heuvel J (ed), *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Petrini O. 1996. Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. In *Endophytic fungi in grasses and woody plants: Systematics, ecology, and evolution*. eds. S. Redlin and L. Carris, 87-100. (St. Paul: APS Press).

Philippot L, Spor A, Hénault C, Bru D, Bizouard F, Jones CM, Sarr A, Maron PA (2013) Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME Journal* 7(8): 1609-1619. doi: [10.1038/ismej.2013.34](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.34)

Pietro-Souza, W., Mello, I. S., Vendruscullo, S. J., Silva, G. F. da, Cunha, C. N. da, White, J. F., & Soares, M. A. (2017). Endophytic fungal communities of *Polygonum acuminatum* and *Aeschynomene fluminensis* are influenced by soil mercury contamination. *PLOS ONE*, 12(7), e0182017. doi:10.1371/journal.pone.0182017

Pinsino, A.; Matranga, V.; Roccheri, M. C. Manganese: a new emerging contaminant in the environment. In: *Environmental contamination*. InTech, 2012.

Pio, M. C. S.; Souza, K. S.; Santana, G. P. Ability of *Lemna aequinoctialis* for removing heavy metals from wastewater. *Acta Amazonica*, v. 43, n. 2, p. 203-210, 2013.

Pires, F. et al. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. *Planta Daninha*, v. 21, n. 2, p. 335-341, 2003.

Pires, I. M. O.; Silva, A. V.; Santos, M. G. S.; Bezerra, J. D. P.; Barbosa, R. N.; Silva, D. C. V.; Svedese, V. M.; Sauza-Motta, C. M.; Paiva, L. M. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma floresta tropical seca no Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia*, v. 9, n. 2, 2015.

Pitt, JI and Taylor, JW. (2014). *Aspergillus*, its sexual states and the new

International Code of Nomenclature. *Mycologia*, 106(5) pp. 1051–1062. doi: 10.3852/14–060

Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; Macdonald, K.D.; Bufton, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, v.5, p.141-148, 1953.

Pott A, Oliveira A, Damasceno Jr G, Silva J (2011) Plant diversity of the Pantanal wetland. *Brazilian Journal of Biology* 71(1 suppl 1): 265-273. doi:[10.1590/s1519-69842011000200005](https://doi.org/10.1590/s1519-69842011000200005)

Pott A, Pott VJ, Moreira SN (2012) Flora and vegetation of Mato Grosso do Sul, Brazil (2012). *Glia* - Revista Electrónica del Grupo Latinoamericano de Liqueñólogos 4: 19-50.

Pott, A.; Silva, J. S. V.; Salis, S. M.; Pott, V. J. & Silva, M. P. 2000. Vegetação e uso da terra. p. 111-131. In: Santos, J. S. V (Org.). *Zoneamento Ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências*. Brasília: Embrapa, 211p.

Qin, W.T., & Zhuang, W.-Y. (2016). Four new species of *Trichoderma* with hyaline ascospores from central China. *Mycological Progress*, 15(8), 811–825. doi:10.1007/s11557-016-1211-y

Quintela-Sabarís, C., Masfaraud, J.-F., Séré, G., Sumail, S., van der Ent, A., Repin, R., ... Leguédois, S. (2019). Effects of reclamation effort on the recovery of ecosystem functions of a tropical degraded serpentinite dump site. *Journal of Geochemical Exploration*. doi:10.1016/j.gexplo.2019.02.004

Radhakrishnan R, Khan AL, Kang SM, Lee IJ. A comparative study of phosphate solubilization and the host plant growth promotion ability of *Fusarium verticillioides* RK01 and *Humicola* sp. KNU01 under salt stress. *AnnMicrobiol*. 2015; 65: 585±593. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0894-z>

Raij B, van Andrade JC, Cantarella H, Quaggio JÁ (2001) Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas Instituto Agrônomo. São Paulo.

Rajendhran, J., and Gunasekaran, P. (2008). Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol. Adv.* 26, 576–590. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.002

Rajendran, P., B. Ashokkumar, J. Muthukrishnan and P. Gunasekaran. 2002. Toxicity assessment of nickel using *Aspergillus niger* and its removal from an industrial effluent. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103: 201–206.

Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 2010; 28(3): 142±149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002> PMID: 20044160

Rajkumar M, Prasad MNV, Freitas H, AE, N. 2009. Biotechnological applications of serpentine bacteria for phytoremediation of heavy metals. *Critical Reviews in Biotechnology* 29: 120-130.

Ramos, Rodrigo Ferraz et al. Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 17, n. 3, p. 417-427, 2018.

Raper KB and Fennell DI (1977) The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Company, Florida.

Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov JR, Salt DE. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinions Biotechnology*, Philadelphia 5: 285-290.

Rho, H., Hsieh, M., Kandel, S.L., Cantillo, J., Doty, S.L., Kim, S., 2017. Do endophytes promote growth of host plants under stress? A meta-analysis on plant stress mitigation by endophytes. *Microb.Ecol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-017-1054-3>.

Riddell RW (1950) Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia* 42: 265-270.

Roque FO, Ochoa-Quintero J, Ribeiro DB, Sugai LSM, Costa-Pereira R, Lourival R, Bino G (2016) Upland habitat loss as a threat to Pantanal wetlands. *Conservation Biology* 30(5): 1131-1134. doi:[10.1111/cobi.12713](https://doi.org/10.1111/cobi.12713)

Roque N, Teles AM, Moura L, Pacheco RA, Silva GH L, Alves M, Nakajima JN (2018) *Check-list de Asteraceae no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (2018) - Iheringia, Série Botânica* 73(supl.): 147-156. doi:10.21826/2446-8231201873s14

Rose, P.K.; Devi, R. Heavy metal tolerance and adaptability assessment of indigenous filamentous fungi isolated from industrial wastewater and sludge samples. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 7 (2018) 688–694.

Rufino, G. M. Bioacumulação e translocação de manganês em *Sinapis alba* e *Brassica juncea* sob doses crescentes deste metal no solo: uma alternativa de fitorremediação. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade de Taubaté, Taubaté.

SaÂnchez-FernaÂndez RE, Diaz D, Duarte G, Lappe-Oliveras P, SaÂnchez S, MacôÂas-rubalcava ML. Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1a: a qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microb Ecol.* 2016; 71: 347±364. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0679-3> PMID: 26408189

Saikkonen K, Gundel PE, Helander M. 2013. Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. *Journal of Chemical Ecology* 39: 962-968.

Sambrook, J.; Russel, D.W. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014; 78:141-173.

Sandermann Junior H (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci* 17:82-84.

Santos JUM (2001) O gênero *Aspilia* Thou. (Asteraceae – Heliantheae) no Brasil. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. Brasil.

Santos, A. E.; Cesar, M. P. F. G.; Bonadio, S. L. Estudo de bacias hidrográficas urbanas como ferramenta para o planejamento territorial sustentável. In: Giometti, A. B. R.; David, C. M. Um descortinar sobre o patrimônio e desenvolvimento sustentável, no século XXI – Volume I. Curitiba: CRV, 2016.

Santos, E. F.; Santini, J. M. K.; Paixao, A. P.; Júnior, E. F.; Lavres, J.; Campos, M.; Reis, A. R. D. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 113, n. 1, p. 6-19, 2017. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.01.022

Santos, J.U. *Aspilia* Thou. (Compositae-Heliantheae). 1987. Novidades taxonômicas no gênero. III. *Bol. Mus. Emílio Goeldi, Sér. Bpt.* 4(1):153-157. 1987.

Santos, S.; Neto, I. F. F.; Machado, M. D.; Soares, H. M. V. M.; Soares, E. V. Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 172, p. 549-560, 2014.

Savi DC, Shaaban KA, Gos FMWR, Ponomareva LV, Thorson JS, Glienke C, Rohr J (2018) *Phaeophleospora vochysiae* Savi & Glienke sp. nov. Isolated from *Vochysia divergens* Found in the Pantanal, Brazil, Produces Bioactive Secondary Metabolites. *Scientific Reports* 8(1): 3122.

Schenberg ACG. 2010. *Biotecnologia e Desenvolvimento Sustentável. Estudos Avançados* 24(70).

Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN. 2006. *Microbial Root Endophytes*. Heidelberg Alemanha, *Soil Biology* (Editores) Springer, 387 p.

Schwyn, B.; Neilands, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analysis Biochemistry*, v. 160(1), p. 46-56, 1987.

Sharma, S. B.; Sayyed, R. Z.; Trivedi, M. H.; Gobi, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, v. 2, p. 587, 2013. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

Shen M, Liu L, Li D, Zhou W, Zhou Z, Zhang C, et al. The effect of endophytic *Peyronellaea* from heavy metal-contaminated and uncontaminated sites on maize growth, heavy metal absorption and accumulation. *Fungal Ecol.* 2013; 6(6): 539±545. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.08.001>

Silva M & Esposito E. 2010. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Esposito E.; Azevedo, J.L. (Ed.) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul (EDUCS), p. 335-375.

Silva, C.F. Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. *Scientia Plena*, v. 14, n. 2, 2018.

Silva, J. S. V. et al. Avaliação integrada do Maciço do Urucum e adjacências – procedimentos e diretrizes. p.922. In: Silva, J. S. V. (Ed.). Zoneamento ambiental da borda oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e adjacências. Brasília: Embrapa Informação e Tecnologia, 2000. 365p.

Silva, S. M. 2007. Crescimento e Capacidade de Biosorção de Metais por *Pleurotus Sajor-Caju*, em Cultivo Líquido e em Cultivo Sólido. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul (RS).

Simon JC, Marchesi JR, Mouge, C, Selosse MA (2019) Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* 7:1-5.

Siqueira, P. B. et al. Caracterização bioquímica e compostos bioativos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.). 2012.

Skirycz A, Castilho A, Chaparro C, Carvalho N, Tzotzos G, Siqueira JO (2014) Canga biodiversity, a matter of mining. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-9. doi:[10.3389/fpls.2014.00653](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00653)

Snowden, R.; Wheeler B. D. 1995. Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. *New Phytol* **131**:503–520.

Soares MA, Li HY, Kowalski KP, Bergen M, Torres MS, White JF. Evaluation of the functional roles of fungal endophytes of *Phragmites australis* from high saline and low saline habitats. *Biol Invasions*. 2016; 18(9): 2689–2702. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1160-z>

Soares, I. A.; Flores, A. C.; Mendonça, M. M.; Barcelos, R. P.; Baroni, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. *Inst. Biol., São Paulo*, v.78, n.2, p.341-350, abr./jun., 2011

Souza VC & Lorenzi H. 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 704 p.

Stepniewska, Z., Kuzniar, A., 2013. Endophytic microorganismse-promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9589e9596.

Strobel G (2018) The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. *Journal of Fungi* 4(2): 57. doi:10.3390/jof4020057

Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 491-502. doi:[10.1128/membr.67.4.491-502.2003](https://doi.org/10.1128/membr.67.4.491-502.2003)

Strobel G, Ericksen A, Sears J, Xie J, Geary B, Blatt B (2017) *Urnula sp.*, an Endophyte of *Dicksonia antarctica*, Making a Fragrant Mixture of Biologically Active Volatile Organic Compounds. *Microbial Ecology* 74(2): 312-321. doi:[10.1007/s00248-017-0947-5](https://doi.org/10.1007/s00248-017-0947-5)

Strobel, G. A. Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. *Natural Product Reports*, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3np70129h>.

Sudha, V.; Govindaraj, R.; Baskar, K.; Al-Dhabi, N. A. Biological properties of endophytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 59, p. 1–7, 2016.

Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Kew, Commonwealth Mycological Institute.

Taiz, L., and Zeiger, E. (2000). *Plant Physiology*, 2nd Edn. San Francisco, CA: Benjamin Cummings Publishing Company.

Tan RX, Zou WX 2001 Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports* 18(4) 448-59. doi:[10.1039/b100918o](https://doi.org/10.1039/b100918o)

Tavares, Anne Caroline Dantas et al. Enzimas Extracelulares de Fungos Anamórficos Isolados de *Morinda citrifolia* L. *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2012.

Teixeira PC, Donagemma GK, Fontana A, Teixeira WG (2017) *Manual de métodos de análise de solo*. 3.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 573p.

Terhonen, E., Blumenstein, K., Kovalchuk, A., & Asiegbu, F. (2019). Forest Tree Microbiomes and Associated Fungal Endophytes: Functional Roles and Impact on Forest Health. *Forests*, 10(1), 42. doi:10.3390/f10010042

Thapa S, Prasanna R (2018) Prospecting the characteristics and significance of the phyllosphere microbiome. *Annals of Microbiology* 68(5): 229-245. doi:[10.1007/s13213-018-1331-5](https://doi.org/10.1007/s13213-018-1331-5)

Tisthammer K, Cobian GM, Amend AS (2016) Global biogeography of marine fungi is shaped by the environment. *Fungal Ecology* 19: 39- 46. doi:[10.1016/j.funeco.2015.09.003](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.09.003)

Tomas WM, de Oliveira Roque F, Morato RG, Medici PE, Chiaravalloti RM, Tortato FR, ... Lourival RFF (2019) Sustainability Agenda for the Pantanal Wetland: Perspectives on a Collaborative Interface for Science, Policy, and Decision-Making.

Tropical Conservation Science 12. <https://doi:10.1177/1940082919872634>

Tomás, M.J.; Sharma, S.K.; Ibstedt S.; Jacobson T.; Christen, P. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*. 2014; 4:252–267.

Tomas, W. M.; Caceres, N. C.; Nunes, A. P; Fischer, E. A.; Mourão, G.; Campos, Z. Mammals in the Pantanal wetland, Brazil. p. 563-595. In: Junk, W. J.; Da Silva, C. J.; Nunes da Cunha, C.; Wantzen, K. M. (Orgs.). *The Pantanal: Ecology, biodiversity and sustainable management of a large neotropical seasonal wetland*. Sofia: Pensoft Publishers, 2010.

Tripathi R. D.; Tripathi P.; Dwivedi S.; Kumar A.; Mishra A.; Chauhan P. S.; Norton G. J.; Nautiyal C. S. 2014. Roles for root iron plaque in sequestration and uptake of heavy metals and metalloids in aquatic and wetland plants. *Metallomics* 6: 1798–1800.

UNITE Community (2019): UNITE mothur release for Fungi. Version 18.11.2018. UNITE Community. <https://doi.org/10.15156/BIO/786340>

Vieira CK, Marascalchi MN, Rodrigues AV, de Armas RD, Stürmer SL (2018) Morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated iron-mining site has the same magnitude of adjacent pristine ecosystems. *Journal of Environmental Sciences* 67: 330-343. doi:[10.1016/j.jes.2017.08.019](https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.08.019)

Visagie C.M, Houbraken J, Frisvad J.C, et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol*. 2014; 78: 343-371.

Vorholt JÁ (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* 10: 828-840. doi:10.1038/nrmicro2910

Vullo DL. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*, n.3, 2003.

Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int J Mol Sci.*;19(4):952. doi:10.3390/ijms19040952

Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press, Boca Raton.

Weber GF (1930). Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani* sp. nov. *Phytopathology* 20: 513–518.

Wehner J, Powell JR, Muller LAH, Caruso T, Veresoglou SD, Hempel S, Matthias C, Rillig MC (2014) Determinants of root-associated fungal communities within Asteraceae in a semi-arid grassland. *Journal of Ecology* 102(2): 425-436. doi:[10.1111/1365-2745.12197](https://doi.org/10.1111/1365-2745.12197)

Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides*

species complex. *Studies in Mycology* 73: 115–180.

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal rRNA genes for phylogenetics. *In* *Protocols: a guide to methods and applications*. PCR Academic press, San Diego, pp 315-322.

Wijesooriya W, Deshappriya N. 2016. An inoculum of endophytic fungi for improved growth of a traditional rice variety in Sri Lanka. *Trop Plant Res.* 3(3):470–480.

Wilcox, D.; Dove, E. B.; McDavid, D.; Greer, D. U. Image Tool. University of Texas. Health Science Centre, San Antonio. 2002.

Wilson, B. R., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y. (2016). Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine*, 22(12), 1077–1090. doi:10.1016/j.molmed.2016.10.005

Xia, Y., Sahib, M.R., Amna, A. *et al.* Culturable endophytic fungal communities associated with plants in organic and conventional farming systems and their effects on plant growth. *Sci Rep* 9, 1669 (2019) doi:10.1038/s41598-018-38230-x

Xu R, Lia T, Cuia H, Wanga J, Yua X, Dinga Y, et al. 2015 Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Appl Soil Ecol* 93: 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.03.013>

Xue, S. G.; Chen, Y. X.; Reeves, R. D.; Baker, A. J., Lin, Q.; Fernando, D. R. Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Environmental Pollution*, v.131, n. 3, p.393-399, 2004.

Yadav, S., Kaushik, R., Saxena, A.K., and Arora, D.K. 2011 Diversity and phylogeny of plant growth-promoting bacilli from moderately acidic soil. *Journal of Basic Microbiology* 51: 98-106.

Yoo, S.-J., Shin, D. J., Won, H. Y., Song, J., & Sang, M. K. (2018). *Aspergillus terreus* JF27 Promotes the Growth of Tomato Plants and Induces Resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mycobiology*, 46(2), 147–153. doi:10.1080/12298093.2018.1475370

Zabochnicka-Świątek, M. and Krzywonos, M. 2014. Potentials of Biosorption and Bioaccumulation Processes for Heavy Metal Removal. *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 23, N^o. 2 551-561.

Zaghloul, A. and Saber, M. 2019. Modern Technologies in Remediation of Heavy Metals in Soils. *Int. J. of Environmental Pollution & Environmental Modelling*, Vol. 2(1):10-19.

Zahir, Z. A., Naveed, M., Zafar, M. I., Rehman, H. S., Arshad, M., and Khalid, M.

(2007). Evaluation of composted organic waste enriched with nitrogen and L-Tryptophan for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). Pak. J. Bot. 39, 1739–1749.

Zahir, Z. A., Shah, M. K., Naveed, M., and Akhter, M. J. (2010). Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. J. Microbiol. Biotechnol. 20, 1288–1294. doi: 10.4014/jmb.1002.02010

Zajc J, Gunde-Cimerman N (2018) The Genus *Wallemia* - From contamination of food to health threat. Microorganisms 6(2): 46. doi: [10.3390/microorganisms6020046](https://doi.org/10.3390/microorganisms6020046)

Zanão Júnior, L. A.; Fontes, R. L. F.; Pereira, J. D.; Carvalho-Zanão, M. P.; Pereira, N. 2019. Toxidez de manganês na planta de arroz atenuada pela ação do silício nos tecidos foliares. Semina. Ciências Agrárias. v. 40, p. 2523-2534.

Zhao D, Li T, Wang J, Zhao Z. (2015) Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data. Microbiol Res. 170: 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.005> PMID: 25294257

Zhao Y, Xiong Z, Wu G, Bai W, Zhu Z, Gao Y, Parmar S, Sharma VK, Li H (2018) Fungal endophytic communities of two wild rose varieties with different powdery mildew susceptibilities. Frontiers in Microbiology 9: 2462. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02462

Zhao, J.; Zhou, L.; Wang, J.; Shan, T.; Zhong, L.; Liu, X.; Gao, X. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendez-Vilas (Ed) p. 567-576. 2010.

Zheng YK, Qiao XG, Miao CP, Liu K, Chen YW, Xu LH et al. (2015) Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. Ann Microbiol 66(2): 529-542. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1153-7>