

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO  
CÂMPUS-RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE  
*Anacardium othonianum* RIZZINI E SEU POTENCIAL  
BIOTECNOLÓGICO**

Autora: Paula Sperotto Alberto  
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

Rio Verde – GO  
Setembro – 2013

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO-CÂMPUS-RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Anacardium  
othonianum* RIZZINI E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Autora: Paula Sperotto Alberto  
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS- AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias-Agronomia do Instituto Federal de educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Câmpus Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias.

Rio Verde – GO  
Setembro – 2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)**  
**Elaborada por Igor Yure Ramos Matos – Bibliotecário CRB1 - 2819**

A29d Alberto, Paula Sperotto.

Diversidade de fungos endofíticos de *Anacardium Othonianum* Rizzini e seu potencial biotecnológico / Paula Sperotto Alberto. – 2013.

56 f.: il., fig. tabs.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus de Rio Verde, 2013.

Biografia.

Inclui índice de tabelas, figuras e lista de símbolos, siglas, abreviações e unidades.

1. *Anacardium othonianum* Rizzini.
  2. Caju-de-árvore-do-cerrado.
  3. fungos endofíticos.
  4. Planta-Cerrado.
- I. Autor.  
II. Título.

CDU: 633.44

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO CÂMPUS-RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Anacardium  
othonianum* RIZZINI E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Autora: Paula Sperotto Alberto  
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias - Agronomia - Área de  
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

APROVADA em 12 de setembro de 2013.

Prof Dr Takeshi Kamada  
*Avaliador externo*  
UniRV

Prof Dr Edson Luiz Souchie  
*Avaliador interno*  
IF Goiano-Câmpus Rio Verde

Prof Dr Fabiano Guimarães Silva  
*Presidente da banca*  
IF Goiano-Câmpus Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida! Por me guiar até aqui com paciência, persistência, confiança e sabedoria para entender cada momento vivido e permitir que neste percurso eu dividisse o caminho com pessoas especiais que me ensinariam muito!

A minha família, meus pais, Paulo Roberto Alberto e Marta Sperotto, a eles devo a pessoa que me tornei! Moldaram-me com muito amor! É deles que vem a minha força e apoio incondicional. Ao meu irmão Gabriel, anjinho que Deus nos presenteou, para tornar mais feliz nossas vidas. Ao meu namorado Flávio Faria Pereira, pela amizade e a escolha de caminhar ao meu lado.

Ao professor Fabiano Guimarães Silva, que me acompanhou desde o início da minha formação acadêmica, pela confiança conquistada e pelas orientações que foram de grande importância para minha formação pessoal e profissional, o qual tenho grande admiração e respeito. O meu muito obrigada!

Ao professor Marcos Antônio Soares, que abriu as portas do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana (UFMT) para a realização deste trabalho e que esteve ao meu lado sempre que necessário, ensinando novas técnicas e conceitos, e colaborando com meu crescimento acadêmico, obrigada por tudo!

A professora Ana Helena Januário pela colaboração na coorientação deste trabalho, muito obrigada!

Ao professor Edson Luiz Souchie, que abriu as portas do Laboratório de Microbiologia Agrícola (IF Goiano), pela colaboração, incentivo e amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Seu João e Dona Lurdinha, obrigada pela ajuda na coleta das plantas, pela hospitalidade, pela amizade e pelo exemplo de pessoas que são.

Aos amigos que fiz, em especial as minhas “amigas-orientadoras” Juliana Silva Rodrigues Cabral, Flávia Dionísio Pereira e Clarice Megguer, que são espelhos para

mim, amigas confidentes e orientadoras exigentes! Obrigada pelo exemplo que são em minha vida!

À Ana Paula Alves Cunha e Jaqueline Alves Senabio, que foram parceiras/integrantes neste trabalho, que Deus retribua a vocês a dedicação que tiveram na execução de cada etapa do trabalho. Obrigada pelo compromisso assumido e pela amizade/companhia durante o experimento.

Às amigas do Laboratório de Microbiologia Agrícola: Cíntia, Liliane, Gabriela e Isabel, que dividiram comigo momentos difíceis, que só foram superados pela colaboração de cada uma e pelo auxílio sempre que solicitado!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias-Agronomia do Instituto Federal Goiano Câmpus Rio Verde, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEG, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

## BIOGRAFIA DA AUTORA

Paula Sperotto Alberto, filha de Paulo Roberto Alberto e Marta Sperotto, nasceu em Santo Augusto, Estado de Rio Grande do Sul, em 26 de julho de 1990. Em 2012, recebeu grau de Licenciatura em Ciências Biológicas, conferido pelo Instituto Federal Goiano - Câmpus Rio Verde. Em março de 2012, iniciou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias-Agronomia pelo Instituto Federal Goiano-Câmpus Rio Verde-GO.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1. O Cerrado Brasileiro.....	15
2. <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini.....	16
3. Interação entre microrganismos e vegetais.....	18
3.1 Síntese de ácido indolacético.....	20
3.2 Solubilização de fosfato.....	20
4 Identificação molecular.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
OBJETIVO GERAL.....	26
TRABALHO CIENTÍFICO. Diversidade de fungos endofíticos de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini e seu potencial biotecnológico.....	27
Resumo .....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1. Material Vegetal .....	30
2.2. Observação da associação entre fungos e raízes de caju-de-árvore-do-cerrado..	31

2.3. Isolamento, caracterização genética e identificação molecular das linhagens de fungos endofíticos cultiváveis.....	31
2.4. Traços funcionais das espécies endofíticas.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1 Observação da associação entre fungos e raízes de caju-de-árvore-do-cerrado.....	34
3.2 Isolamento, caracterização genética e identificação molecular das linhagens de fungos endofíticos cultiváveis.....	39
3.3 Traços funcionais das espécies endofíticas.....	46
4. CONCLUSÃO .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Identificação dos isolados fúngicos endofíticos isolados de <i>Anacardium othonianum</i> , coletados no município de Montes Claros de Goiás - GO, 2013.....	42
<b>Tabela 2.</b> Solubilização <i>in vitro</i> de fosfato de cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ), ferro (FePO <sub>4</sub> ) e alumínio (AlPO <sub>4</sub> ) por microrganismos endofíticos de caju-de-árvore-do-cerrado ( <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini). Rio Verde - GO, 2013.....	47
<b>Tabela 3.</b> Produção <i>in vitro</i> de ácido indolacético (AIA) por microrganismos endofíticos de caju-de-árvore-do-cerrado ( <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini). Rio Verde – GO, 2013. ....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Introdução Geral</b>	
<b>Figura 1.</b> Aspecto visual de uma planta adulta (A), folhas e fruto (B) de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini. ....	17
<b>Trabalho Científico</b>	
<b>Figura 1.</b> Estruturas de fungos endofíticos <i>dark septate</i> em raízes de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini, coltado em Montes Claros de Goiás, GO. Legenda: HD hifas de <i>dark septate</i> , MS microesclerócio.....	35
<b>Figura. 2</b> Estruturas de fungos micorrízicos colonizando raízes de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini, coletado no município de Montes Claros de Goiás. A: Vesícula, arbúsculo e hifas. B: Hifas enoveladas. C: Hifas contendo gotículas de lipídios. D: Vesícula intercelular armazenando lipídios. E: Vesícula e arbúsculo intracelular. F: Vesícula alongada e arbúsculo bastante ramificado. Legenda: A (arbúsculos), V (vesículas), H (hifas), HE (hifas enoveladas).....	37
<b>Figura 3.</b> Similaridade entre os morfotipos de fungos de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini, coletado em Montes Claros de Goiás, GO pelo marcador ISSR e IRAP. Rio Verde – GO, 2013.....	40
<b>Figura 4.</b> Análise molecular filogenética pelo método de máxima verossimilhança, entre isolados fúngicos endofíticos de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini, coletado no município de Montes Claros de Goiás, Rio Verde – GO, 2013.....	44

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

$\mu\text{m}$ .....	Micromol
A.....	Arbúsculos
AIA.....	Ácido indolacético
Al.....	Alumínio
$\text{AlPO}_4$ .....	Fosfato de alumínio
AN.....	Ágar nutriente
BDA.....	Ágar, batata e dextrose
Ca.....	Cálcio
$\text{CaHPO}_4$ .....	Fosfato de cálcio
cm.....	Centímetros
DSE.....	Microrganismo endofítico <i>dark septate</i>
$\text{Fe PO}_4$ .....	Fosfato de Ferro
FMA.....	Fungo micorrízico arbuscular
g.....	Gramas
H.....	Hifas
h.....	Horas
$\text{H}_2\text{O}_2$ .....	Peróxido de hidrogênio
HD.....	Hifas de <i>dark septate</i>
HE.....	Hifas enoveladas
IRAP-PCR.....	Inter-RetrotransposonAmplified Polymorphisms
ISSR-PCR. ....	Inter-Simple Sequence Repeats
ITS.....	Espaçador interno transcrito
KOH.....	Hidróxido de Potássio
m.....	Metros
Min.....	Minutos
MS.....	Microesclerócio
$^{\circ}\text{C}$ .....	Graus Celsius
OTUS.....	Unidade taxonomia operacional
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
pH.....	Potencial de hidrogênio
V.....	Vesícula

## RESUMO

As plantas mantêm relações simbióticas com microrganismos como estratégia para suportar as adversidades, a partir deste canal de troca os microrganismos recebem fotoassimilados e proporcionam benefícios ao vegetal. *Anacardium othonianum* Rizzini conhecido como caju-de-árvore-do-cerrado é uma espécie arbórea da família anacardiaceae nativa da região centro-oeste do Brasil. Objetivou-se com este trabalho caracterizar a comunidade de fungos endofíticos cultiváveis e seus traços funcionais, associados às raízes de *Anacardium othonianum* Rizzini. Raízes de *A. othonianum* foram fragmentadas a um cm e inoculadas em meio para isolamento de microrganismos endofíticos, a identificação molecular dos isolados foi realizada pelo sequenciamento parcial do espaçador interno transcrito (ITS). Os isolados endofíticos obtidos foram testados quanto da síntese de ácido indolacético e solubilização de fosfato por método colorimétrico. Fragmentos de raízes foram diafanizadas, coradas e analisadas em microscópio. Foram encontradas estruturas características de microrganismos endomicorrízicos e endofíticos nas lâminas analisadas. 67 linhagens de fungos foram isoladas e identificadas por métodos moleculares em 12 espécies: *Fusarium oxysporum*, *Bionectria ochroleuca*, *Periconia macrospinoso*, *Phomopsis lagerstroemiae*, *Penicillium kloeckeri*, *Eupenicillium shearii*, *Phomopsis asparagi*, *Penicillium pinophilum*, *Agaricomycetes sp.*, *Diaporthe sp.*, *Cladosporium cladosporioide* e *Paecilomyces lilacinus*. Todos os gêneros encontrados já foram relatados na literatura como espécie endofítica. Conclui-se com esse trabalho que *A. othonianum* mantém associação a fungos e endomicorrízicos e endofíticos. Doze linhagens endofíticas foram isoladas de *Anacardium othonianum* Rizzini, destas sete possuem potencial de solubilização de fosfato e de sintetizar AIA.

**Palavras-chaves:** simbiose, diversidade genética, caju-de-árvore-do-cerrado.

## ABSTRACT

Plants maintain symbiotic relationships with microorganisms as a strategy to withstand adversity, from this exchange channel microorganisms receive assimilates and provide benefits to the plant. *Anacardium othonianum* Rizzini known as the savanna-cashew-tree is a tree of the Anacardiaceae family native in the central-western region of Brazil. The objective of this work was to characterize the community of culturable endophytic fungi and their functional traits, associated with the roots of *Anacardium othonianum* Rizzini. Roots of *A. othonianum* were fragmented to 1cm and inoculated into medium for isolation of endophytic microorganisms. The molecular identification of the isolates was performed by partial sequencing of the internal transcribed spacer (ITS). Endophytic isolates were tested for the synthesis of indoleacetic acid and phosphate solubilization by colorimetric method. Root fragments were cleared, stained and examined under a microscope. There were found characteristic structures of mycorrhizal and endophytic microorganisms in the analyzed slides. A total of 67 strains of fungi were isolated and identified by molecular methods in 12 species: *Fusarium oxysporum*, *Bionectria ochroleuca*, *Periconia macrospinoso*, *Phomopsis lagerstroemiae*, *Penicillium kloeckeri*, *Eupenicillium shearii*, *Phomopsis asparagine*, *Penicillium pinophilum*, *Agaricomycetes sp.*, *Diaporthe sp.*, *Cladosporium* and *cladosporioide Paecilomyces lilacinus*. All genera found have been reported in the literature as endophytic species. It is concluded from this work that *A. othonianum* maintains association to fungi and endomycorrhizal and endophytic. Twelve endophytic fungi were isolated from *Anacardium othonianum* Rizzini, from these seven have potential for phosphate solubilization and synthesize IAA.

**Key words:** Symbiosis, genetic diversity, savannah-cashew-tree

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. O Cerrado Brasileiro

O Cerrado é considerado um dos domínios de maior biodiversidade vegetal do mundo, com área de 204 milhões de hectares, correspondendo a aproximadamente a 22% do território brasileiro, distribuído nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal (Silva e Bates, 2002).

O Cerrado brasileiro concentra sobre a sua superfície uma fonte inestimável de recursos biológicos, pouco explorados e de elevado potencial econômico, com grande número de espécies medicinais, frutíferas, ornamentais e fornecedoras de madeira (Castro, 2005). Sabe-se que o bioma Cerrado vem sofrendo, desde a metade do século passado, um grave processo de degradação e intensificação do uso do solo para fins agro-pastoris, sendo que se não forem reduzidas as taxas de desmatamento o Brasil perderá o restante da cobertura vegetal remanescente do Cerrado (cerca de 50%) (Sano et al., 2010).

O Cerrado tem mais de 12 mil espécies vasculares, compondo a savana mais rica do mundo e foi incluído entre as 34 áreas consideradas críticas para conservação da diversidade biológica no mundo (hotspots) por causa de sua riqueza e a alta pressão antrópica a que tem sido submetido (Silva e Bates, 2002).

Sua vegetação é composta por um mosaico representado por formações florestais, savânicas e campestres, onde a vegetação possui estratégias de adaptação à seca, como a germinação de sementes na época das chuvas, crescimento radicular rápido nos primeiros estádios de desenvolvimento, controle de transpiração e diminuição de taxas fotossintéticas, além de manter simbiose com microrganismos promotores de crescimento vegetal (Gull et al., 2004).

Os microrganismos são responsáveis pela manutenção da flora do Cerrado, ao serem responsáveis por degradar a matéria orgânica e assim reciclar os nutrientes no solo, pela decomposição de xenobióticos e o controle biológico de pragas e doenças, porém o conhecimento sobre a microbiota deste domínio ainda é escasso (Bresolin et al., 2010). Alguns estudos confirmam a diversidade da comunidade microbiana do solo, Castro et al., (2008) mostraram notável diferença em comunidades de fungos de solo entre uma área de mata ciliar, pasto e plantação de soja em solos de Cerrado.

## **2 *Anacardium othonianum* Rizzini**

O gênero *Anacardium* pertence à família Anacardiaceae, que compreende cerca de 74 gêneros e 600 espécies. É composto por 10 espécies de árvores, arbustos e subarbustos rústicos, típicos de clima tropical, sendo o principal centro de diversidade do gênero, a região Amazônica e, como centro secundário estão os Cerrados (Paiva et al., 2003).

De acordo com a classificação de Rizzini (Joly, 1993), o *Anacardium othonianum* tem a seguinte posição sistemática:

Divisão: Magnoliophyta;

Classe: Magnoliopsida;

Ordem: Sapindales;

Família: Anacardiaceae;

Gênero: *Anacardium*;

Espécie: *Anacardium othonianum*.

O *Anacardium othonianum* Rizzini, também conhecido como Caju-de-árvore-do-Cerrado, cajuzinho e cajuí, distingue das demais espécies do Cerrado: *A. humile*, *A. nanum* e *A. corymbosum*, pelo seu porte arbóreo, sendo o principal cajueiro de importância econômica para a região Centro-Oeste, encontrado em Campo Sujo e Cerradão (Correa et al., 2008).

Esta espécie pode atingir até 6 m de comprimento e 20-40 cm de diâmetro, possui folhas coriáceas que medem 12-17 cm x 8-11 cm, flores hermafroditas e unissexuais. Seu fruto é um aquênio, cujo pedúnculo se desenvolve em pseudofruto, que tem forma variada e coloração de amarela a vermelha, sendo o fruto (castanha) e o pseudofruto constituintes do duplo fruto característico do gênero (Figura1) (Vieira et al., 2006; Correa et al., 2008).



**Figura 1.** Aspecto visual de uma planta adulta (A), folhas e fruto (B) de *Anacardium othonianum* Rizzini.

O pseudofruto pode ser consumido na forma de sucos, licores, geleias, rapaduras, sorvetes, produtos cristalizados e aguardentes (Vieira et al., 2006; Correa et al., 2008). O consumo do cajuzinho na alimentação foi reforçado, pela comprovação dos altos valores nutricionais de seu pseudofruto, valores proteicos de  $1,18 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ; lipídios ( $0,63 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), carboidratos ( $6,97 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), fibra alimentar ( $4,26 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), resultando num valor energético total de ( $38,27 \text{ kcal} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) destaca-se pelos seus valores de o cálcio ( $15 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) zinco ( $0,65 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e ferro ( $0,26 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) além de ser rico em vitamina C e em compostos fenólicos, em especial taninos que lhe confere adstringência (Silva et al., 2008).

O fruto é do tipo drupa reniforme (castanha), contendo cerca de 46,5% de lipídios (Gallina et al., 1993; Lima et al., 2004). O líquido da casca da castanha de caju (LCC) é muito empregado na indústria química para a produção de polímeros, que são utilizados na produção de matérias plásticas, isolantes e vernizes. Este óleo representa cerca de 25% do peso da castanha de caju; é constituído principalmente por compostos fenólicos, como o ácido anacárdico, o cardol e o cardanol. Os ácidos anacárdicos, são inibidores de enzima acetilcolinesterase, atuando com propriedades antimicrobianas, anticoagulante e antitumorais (Vieira et al., 2006).

O *Anacardium othonianum* é encontrado em altitudes entre 380 e 1100m, ocorrendo, em maiores densidades, em altitudes acima de 790m. Seu florescimento

acontece entre junho e outubro, com produtividade de 200 a 600 frutos por planta, pesando cada um entre 5 e 10 g, sendo colhidos entre setembro e outubro (Correa et al., 2008).

Esta espécie é adaptada à região do Cerrado, possui tolerância a temperaturas elevadas, períodos de secas e solos ácidos (pH 4,5 – 6,5). Este comportamento de preferência por ambientes desfavoráveis associados aos solos com maiores declividades faz com que tenha elevado potencial para exploração, preservação e manejo de grandes áreas no Cerrado (Vieira et al., 2006).

Com isso uma alternativa para maximizar produção de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado é a inoculação de microrganismos, isto porque, vários estudos demonstraram a capacidade destes microrganismos em auxiliar o desenvolvimento de seu hospedeiro pela capacidade de produção de hormônios vegetais e a disponibilização de fósforo (P) que auxiliaram o crescimento da planta hospedeira (Piccoli et al., 2011; Elgharably e Marschner 2011; Kochar et al., 2011).

O caju-de-árvore-do-cerrado tem grande potencial para exploração econômica, porém informações essenciais sobre essa cultura, bem como a comunidade microbiana que mantém associação com esta espécie são escassas.

### **3. Interação entre microrganismos e vegetais**

Os microrganismos constituem um universo pouco explorado da biodiversidade do Cerrado, representando grande potencial, seja para estudos de aplicação biotecnológica ou para descrição de novas espécies (Mesquita et al., 2013).

Em 1997, a microbiota no Cerrado tinha como representante cerca de 875 espécies conhecidas. Porém, de acordo com a estimativa feita por Hawksworth (1991) baseado na proporção de seis espécies de fungos por espécie vegetal, este número pode representar menos de 4,5% das possíveis espécies existentes na região. Portanto, haveria ao menos 24.000 espécies de fungos no Cerrado ainda desconhecidas (Santos et al., 2011).

Diversas espécies de fungos obtêm seus nutrientes de outros organismos utilizando diferentes estratégias, desde parasitismo, comensalismo até mutualismo. E, grande parcela destas espécies está associada de alguma forma à planta, seja na superfície (epifíticos), no interior dos tecidos (endofítico) ou na rizosfera. Devido às

pesquisas de isolamento de microrganismos, sabe-se que as plantas são microecossistemas e excelentes hospedeiras (You et al., 2012).

Uma interação entre o sistema radicular de plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pode funcionar como canais de troca de informações entre as plantas conectadas e, conseqüentemente, influenciar no estabelecimento, na competição, diversidade e dinâmica da comunidade vegetal (Selosse et al., 2006).

Plantas nativas do Cerrado possuem maior crescimento quando inoculadas com FMA. Isso foi confirmado em mudas de angico (*Anadenanthera macrocarpa* B.), jenipapo (*Genipa americana* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.) e porta-enxertos de pessegueiro cv. Okinawa (*Prunus persica* L.) (Carneiro et al., 2009; Sugai et al., 2011; Nunes et al., 2011; Soares et al., 2012).

Os microrganismos que vivem dentro da planta sem causar danos visíveis ou alterações morfológicas no seu hospedeiro são conhecidos como microrganismos endofíticos (Kogel et al., 2006). A interação entre planta e endofíticos depende de um equilíbrio antagônico, pois microrganismos considerados como endofíticos podem ser fitopatógenos, pelo estímulo ambiental e fatores de estresse (Khan et al., 2008; Druzhinina et al., 2011).

Acredita-se que espécies endofíticas podem ter evoluído a partir de fungos patogênicos possuidores de longos períodos de latência ou que perderam sua virulência (Wang et al., 2007). Segundo Ma et al., (2011), os microrganismos endofíticos podem ser eficientes no estabelecimento de plantas em programas de remediação em solos contaminados por metais pesados.

Na associação mutualística entre planta-endofítico, o microrganismo recebe nutrição e microhabitat da planta hospedeira, aumentando sua possibilidade de sobrevivência e garante sua disseminação (Muller e Krauss, 2005). O hospedeiro se beneficia aumentando sua capacidade competitiva frente a estresses bióticos e abióticos, porque o microrganismo proporciona benefícios através da produção, indução ou inibição de metabólitos, enzimas, que atuam no controle biológico, solubilização de fosfatos, síntese de fitormônio e na biorremediação de compostos recalcitrantes (Piccoli et al., 2011).

A colonização dos microrganismos endofíticos ocorre através da penetração dos órgãos vegetais por aberturas naturais como estômatos e/ou hidatódios, pelas raízes secundárias, ou ainda através de ferimentos. Também pode ocorrer penetração ativa de endofíticos por produção de enzimas ou estruturas que facilitam o processo. Alguns

microrganismos endofíticos têm capacidade de perpetuar sua colonização no hospedeiro através da transmissão vertical (Wang et al., 2007).

Khan et al., (2012) ao estudar *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) e *Sitka sitchensis* descobriram que plantas inoculadas com endofíticos não só tiveram melhor viabilidade e florescimento precoce e frutificação, mas também incrementam seu crescimento e a produção de frutos quando cultivadas em solo com nitrogênio limitado. Os autores ainda afirmam que a utilização de endófitos específicos pode ser preferível a utilização de fertilizantes químicos, em razão dos custos monetários e ambientais, contribuindo para sistemas agrícolas mais sustentáveis.

As plantas, geralmente, são repletas de microrganismos que colonizam suas estruturas externa e internas. Esses microrganismos fornecem novas vias nutricionais e de defesa, influenciando rotas bioquímicas nas plantas. Muitos caracteres vegetais são mediados pela microbiota funcional, dessa forma, os microrganismos podem influenciar os ecossistemas através de seus efeitos funcionais sobre a dinâmica populacional de seus hospedeiros. Esses efeitos são atualmente chamados de traços funcionais (Friesen et al., 2011).

### **3.1 Síntese de ácido indolacético**

A síntese de fitormônios por microrganismos maximiza o crescimento vegetal, quando comparado aos indivíduos que não mantêm relação simbiótica com os mesmos. Dentre as auxinas, o ácido indolacético (AIA) é o mais estudado, essa substância afeta a morfologia das raízes, aumenta o comprimento e o número de pelos radiculares, permite explorar novas regiões e aumentado a área de captação radicular (Piccoli et al., 2011).

Isolados endofíticos de *Trichoderma* testados por Badawi et al. (2011) e Oliveira et al. (2012) foram capazes de produzir AIA *in vitro* e o uso do precursor L-triptofano proporcionou efeito positivo como indutor para a síntese deste fitormônio. Segundo Vitorino et al., (2012) 52% dos isolados endofíticos de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae), foram capazes de sintetizar AIA *in vitro*.

### **3.2 Solubilização de fosfato**

O fósforo (P) é considerado um macronutriente essencial ao crescimento e desenvolvimento vegetal, tendo em vista sua atuação estrutural, funcional e na transferência de energia (Ma et al.,2011). Muitos tipos de solos são deficientes em P,

tendo sua concentração menor que 10  $\mu\text{M}$  em pH 6,5, no qual o P está insolúvel, além de ser adsorvido na superfície dos minerais de argila, em solos neutros ou alcalinos, ou na superfície de óxidos de ferro e de alumínio e minerais de argila em solos ácidos (Elgharably e Marschner, 2011).

Alguns microrganismos presentes nos solos possuem papel importante no ciclo natural do P, sendo responsáveis pela sua hidrólise para a forma inorgânica, tornando-o disponível às plantas. Estes processos são mediados por enzimas, ácidos orgânicos e sideróforos (Xiang et al., 2012).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato atuam sobre o fosfato insolúvel por meio de fosfatases, principalmente fosfatases ácidas, com a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos reduzindo o pH, obtendo então o fosfato disponível para as plantas (Pelzer et al., 2011; Ma et al., 2011).

Isolados endofíticos de *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae), espécie nativa do Cerrado, demonstraram capacidade de solubilização de fosfato, em especial três cepas foram classificadas como de alto potencial, pois obtiveram valores superiores na solubilização de fosfato e na síntese de AIA (Vitorino et al., 2012).

#### **4 Identificação molecular**

A análise molecular é uma ferramenta importante no estabelecimento de um sistema de identificação de fungos. Estudos vêm aplicando esta técnica molecular que tem demonstrado ser um método rápido na identificação de espécies, tais como: *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sporotrichioides* e *Penicillium expansum* (Lorenço et al., 2007).

Análises de fragmentos de restrição de DNA amplificados por PCR (Polimerase chain reaction) constituem uma ferramenta poderosa que permite a detecção de moléculas de ácidos nucleicos específicos presentes em pequenas quantidades e é aplicada com sucesso na identificação de fungos. O uso da PCR com *primers* que flanqueiam a região genômica do ITS (Internal transcribed spacer) tem permitido a identificação taxonômica dos fungos sem os problemas de variações nos caracteres morfológicos que dificultam a taxonomia tradicional (Satow et al., 2008; Badali et al., 2009)

O DNAr contém repetições que são separadas por regiões não transcritas, que geralmente não apresentam variação de sequência; e regiões internas que apresentam

variações na sequência e são transcritas (ITS 1 e ITS 2). Assim, dados oriundos de sequenciamento da região ITS são utilizados para estudos de filogenia e evolução, bem como para identificação e descoberta de novas espécies (Satow et al., 2008; Badali et al., 2008; Bridge e Newsham, 2009).

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; BONIFAZ, A.; GERRITS, V.; DENENDE, A. H. D.; DE HOOG, G. S.; Biodiversity of the genus *Cladophialophora*, **Studies in Mycology**. v. 61, n. 1, p.175-191, 2008.

BADALI, H.; CARVALHO V. O; VICENTE, V; ATTILI-ANGELIS, D.; KWIATKOWSKI I. B.; GERRITS, V. D. E.; DE HOOG, G. S. *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data. **Medical Mycology**. v.47, n.1, p.51-62, 2009.

BADAWI, F. S. F.; BIOMY, A. M. M.; DESOKY, A. H. Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, n. 1, p. 17-25, 2011.

BRESOLIN, J. D.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRÜGER, R. H.; SILVA, M. R. S. S. ; PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado, Brazil, **Journal Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 391-403, 2010.

BRIDGE, P. D.; NEWSHAM, K. K. Soil fungal community composition at Mars Oasis a southern maritime Antarctic site, assessed by PCR amplification and cloning. **Fungal Ecology** v. 2, n. 1, p.66-74, 2009.

CARNEIRO, R. F. V.; EVANGELISTA, A. R.; ARAÚJO, A. S. F. Crescimento vegetativo e aquisição de nutrientes pela alfafa em resposta à micorríza e doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.1, n. 03, p. 267-273, 2009.

CASTRO, A. H. F., ALVARENGA, A. A., SOARES, A. M., YOUNG, M. C. M., PURCINO, A. A. C. Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.7, n.3, p.45-55, 2005.

CASTRO, A. P., QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. JR.; KUROKAWA, A. S.; NETO, E. L.; KRÜGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields, **ArchiveMicrobiology**, v. 190, n. 1, p. 129-139, 2008.

CORREA, G. de C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R. da; CHAVES, L. J.; BORGES, J. D. Determinações Físicas em frutos e sementes de Baru(*Dipteryx alta* Vog.), Cajuzinho

(*Anacardium othonianum* Rizz.) e Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) , visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, p. 42-47, 2008.

DRUZHININA, I. S.; SEIBOTH, V. S.; ESTRELLA, A. H.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 749-759, 2011.

ELGHARABLY, A.; MARSCHENER, P. Microbial activity and biomass and N and P availability in a saline sandy loam amended with inorganic N and lupin residues. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 5, p. 310-315, 2011.

FRIESEN, M.; PORTER, S. S.; STARK, S. C.; WETTBERG, E. J. V.; SACHS, J. L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Microbially Mediated Plant Functional Traits. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Systemat.** v. 43, n. 1, p. 23-46, 2011.

GALLINA, T.; CABONI, M. F.; PENAZZI, G., LERCKER, G.; CAPELLA, P. A study on cashew nut oil composition. **Journal of the American Oil Chemist's Society, Champaign**. v. 70, n. 10, p. 1017-1020, 1993.

GULL, M.; HAFEEZ, F. Y.; SALEEM, M.; MALIK, K. A.; Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and mixed rhizobial culture. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, n. 6, p. 623-628, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.

JOLY, A. B. **Botânica introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Ed. Nacional, p. 777, 1993.

KHAN, Z.; KIM, S. G.; JEON, Y. H.; KHAN, H. U.; SON, S. H.; KIM, Y. H. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. **Bioresouce Technology**, v. 99, n. 8, p. 3016-3023, 2008.

KHAN, Z.; GUELICH, G.; PHAN, H.; REDMAN, R.; DOTY, Bacterial and Yeast Endophytes from Poplar and Willow Promote Growth in Crop Plants and Grasses. **International Scholarly Research Network**. v. 2012, n. 1, p. 1-11, 2012.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 426-432, 2011.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – What decides? **Current Opinion in Plant Biology**. v. 9, n. 4, p. 358-368, 2006.

LIMA, A. C.; GARCIA, N. H. P.; LIMA, J. R. Obtenção e caracterização dos produtos do caju. **Boletim CEPPA**, v. 22, n. 1, p. 133-144, 2004.

LOURENÇO, A.; DURIGON, E. L.; ZANOTTO, P. Genetic diversity of environmental *Aspergillus flavus* strains in the state of São Paulo, Brazil by random amplified polymorphic DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 687-692, 2007.

MA, Y.; RAJKUMARB, M.; LUOA, Y.; FREITAS, H. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants--effects on plant growth and Ni uptake. **Journal of hazardous materials**. v. 195,n. 1, p. 230-237, 2011.

MESQUITA, V. A.; MAGALHÃES, K. T.; BATISTA, C. F. S.; SCHWAN, R. F. The Molecular Phylogenetic Diversity of Bacteria and Fungi Associated with the Cerrado Soil from Different Regions of Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n.2, p. 119-131, 2013.

MULLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in. Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 450-456, 2005.

NUNES, J. L. S.; SOUZA, P. V. D.; MARODIN, G. A. B; FACHINELLO, J. C. Incremento no desenvolvimento do portaenxertos de pessegueiro 'Okinawa', promovido por fungos micorrízicos arbusculares autóctones. **Ceres**, v. 58, n. 02, p. 223-231, 2011.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

PAIVA, J. R.; CRISOSTOMO, J. R.; BARROS, L. M. Recursos Genéticos do cajueiro: coleta, conservação, caracterização e utilização. Fortaleza: **EMBRAPA-CNPAT**. p. 43, 2003.

PELZER, G. Q.; HELFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K.L.; SOUZA, G. R.; ZILLI, J. E.; PERIN, L.. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Trop. Plant Pathol.**, v. 36, n. 2, p. 95-103, 2011.

PICCOLI, P.; TRAVAGLIA, C.; COHEN, A.; SOSAL, L.; CORNEJO, P.; MASUELLI, R.; BOTTINI, R. An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A1 and A3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. **Plant Growth Regulation**, v. 64, n. 2, p. 207-210, 2011.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environental Monitoring and Assessment** v. 166, n. 1-4, p. 113-124, 2010.

SANTOS, L. T. P. Microbiota foliicola de *Salacia crassifolia*. Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

SATOW, M. M; ATTILI-ANGELIS, D.; DE HOOG, S. G.; VICENTE, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies**

in **Mycology**, v. 61, n.1, p. 157-163, 2008.

SELOSSE, M.-A.; RICHARD, F.; HE, X.; SIMARD, S. W. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? **Trends in ecology & evolution**, v. 21, n. 11, p. 621-8, 2006.

SILVA, J. M. C. e BATES, J.M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, v.52, p.225-233, 2002.

SILVA, M. R.; LACERDA, B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. de O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 8, n. 6, p. 1790-1793, 2008.

SOARES A. C. F.; SOUSA C. S.; GARRIDO M. S.; LIMA F. S. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas de jenipapeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 47-54, 2012.

SUGAI, M. A. A.; COLLIER, L. S.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. Inoculação micorrízica no crescimento de mudas de angico em solo de cerrado. **Bragantina**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 416-423, 2011.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S.; SILVA, D. B. da; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 320, 2006.

VITORINO, L. C., SILVA, F. G., SOARES, M. A., SOUCHIE, E. L., COSTA, A. C.; LIMA, W. C. Solubilization of calcium and iron phosphate and *in vitro* production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). **International Research Journal of Biotechnology**. v. 3, n.4, p. 47-54, 2012.

WANG, B.; PRIEST, M. J.; DAVIDSON, A.; BRUBAKER, C. L.; WOODS, M. J.; BURDON, J. J. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. **Mycological Research**, v. 111, n. 3, p. 347-354, 2007.

YOU, Y.-H. et al. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in suncheon bay. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1549-56, 2012.

XIANG, Y. P.; LI, M.; HUI, C. M.; QIN, X. J.; FENG, H.; QUN, D. C.; HE, M. M.; HUANG, F. D.; QING, D. Y.; XIANG, Y. F. Phosphate solubilizing ability and phylogenetic diversity of bacteria from P-rich soils around Dianchi lake drainage area of China. **Pedosphere**, v. 22, n.5, p. 707-716, 2012.

## **OBJETIVO GERAL**

Caracterizar as populações de fungos endofíticos cultiváveis e seus traços funcionais, associados às raízes de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizzini).

## Diversidade de fungos endofíticos de *Anacardium othonianum* Rizzini e seu potencial biotecnológico

**Resumo:** As plantas mantêm relações simbióticas com microrganismos como estratégia para suportar as adversidades, a partir deste canal de troca os microrganismos recebem fotoassimilados e proporcionam benefícios ao vegetal. *Anacardium othonianum* Rizzini conhecido como caju-de-árvore-do-cerrado é uma espécie nativa da região centro-oeste do Brasil. Objetivou-se com este trabalho caracterizar a comunidade de fungos endofíticos cultiváveis e seus traços funcionais, associados às raízes de *Anacardium othonianum* Rizzini. Raízes de *A. othonianum* inoculadas em meio para isolamento de microrganismos endofíticos, a identificação molecular dos isolados foi realizada pelo sequenciamento parcial do espaçador interno transcrito (ITS). Os isolados endofíticos obtidos foram testados quanto a síntese de ácido indolacético e solubilização de fosfato por método colorimétrico. Foram encontradas estruturas características de microrganismos endomicorrízicos e endofíticos nas lâminas analisadas. 67 linhagens de fungos foram isoladas e identificadas por métodos moleculares em 12 espécies: *Fusarium oxysporum*, *Bionectria ochroleuca*, *Periconia macrospinosa*, *Phomopsis lagerstroemiae*, *Penicillium kloeckeri*, *Eupenicillium shearii*, *Phomopsis asparagi*, *Penicillium pinophilum*, *Agaricomycetes sp.*, *Diaporthe sp.*, *Cladosporium cladosporioide* e *Paecilomyces lilacinus*. Conclui-se com esse trabalho que *A. othonianum* mantém associação a fungos e endomicorrízicos e endofíticos. Doze linhagens endofíticas foram isoladas de *Anacardium othonianum* Rizzini, destas sete possuem potencial de solubilização de fosfato e de sintetizar AIA.

**Palavras-chaves:** simbiose, diversidade genética, caju-de-árvore-do-cerrado.

## Diversity of endophytic fungi of *Anacardium othonianum* Rizzini and its biotechnological potential

**Abstract:** Plants maintain symbiotic relationships with microorganisms as a strategy to withstand adversity, from this exchange channel microorganisms receive assimilates and provide benefits to the plant. *Anacardium othonianum* Rizzini known as the savanna-cashew-tree is a native species in the central-western region of Brazil. The objective of this work was to characterize the community of culturable endophytic fungi and their functional traits, associated with the roots of *Anacardium othonianum* Rizzini. Roots of *A. othonianum* were inoculated into medium for isolation of endophytic microorganisms. The molecular identification of the isolates was performed by partial sequencing of the internal transcribed spacer (ITS). The Endophytic isolates were tested for the synthesis of indoleacetic acid and phosphate solubilization by colorimetric method. There were found characteristic structures of mycorrhizal and endophytic microorganisms in the analyzed slides. A total of 67 strains of fungi were isolated and identified by molecular methods in 12 species: *Fusarium oxysporum*, *Bionectria ochroleuca*, *Periconia macrospinosa*, *Phomopsis lagerstroemiae*, *Penicillium kloeckeri*, *Eupenicillium shearii*, *Phomopsis asparagine*, *Penicillium pinophilum*, *Agaricomycetes sp.*, *Diaporthe sp.*, *Cladosporium* and *cladosporioide Paecilomyces lilacinus*. It is concluded from this work that *A. othonianum* maintains association to fungi and endomycorrhizal and endophytic. Twelve endophytic fungi were isolated from *Anacardium othonianum* Rizzini, from these seven have potential for phosphate solubilization and synthesise IAA.

**Key words:** Symbiosis, genetic diversity, savannah-cashew-tree.

### 1. Introdução

Os microrganismos constituem um universo pouco explorado da biodiversidade do Cerrado, representando um grande potencial biológico a ser explorado, seja para estudos de aplicação biotecnológica como para descrição de novas espécies. Em 1997, a microbiota fúngica conhecida era representada por 875 espécies distribuídas em 301 gêneros. Porém, de acordo com Hawksworth (1991), que se baseia na proporção de seis espécies de fungos por espécie vegetal, este número pode representar menos de 4,5%

das possíveis espécies existentes na região. Portanto, haveria ao menos 24.000 espécies de fungos no Cerrado ainda desconhecidos (Santos, 2011).

Diversas espécies de fungos obtêm seus nutrientes de outros organismos utilizando diferentes estratégias, como parasitismo, comensalismo ou simbiose. Grande parcela destas espécies está associada de alguma forma as plantas, seja na rizosfera, na superfície ou no interior dos tecidos como endofítico. Nas relações simbióticas entre plantas e microrganismos normalmente o vegetal utiliza a associação como estratégia para suportar as adversidades bióticas e abióticas (Guo et al., 2008; Piccoli et al., 2011; You et al., 2012).

A conexão entre sistemas radiculares de plantas hospedeiras é bastante documentada em fungos endomicorrízicos, em especial micorrízicos arbusculares (FMA) pertencentes ao filo Glomeromycota (Helgason e Fitter, 2009), justamente por fornecer benefício e pela sua baixa especificidade ao hospedeiro (Sharma e Jha, 2012).

Esta conexão pode funcionar como canal de troca de informações e conseqüentemente, influenciar no estabelecimento de plântulas, competição, diversidade e dinâmica da comunidade vegetal. Mas, principalmente auxilia as plantas na absorção de nutrientes e água, e o benefício da associação para a planta surge do aumento da extensão da superfície de absorção, em troca, o fungo recebe carboidratos da planta (Wu, et al., 2009; Zhan, et al., 2011).

Já foi observado que a inoculação de FMA em pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) proporcionou incremento na biomassa de parte aérea e raiz (Saboya et al., 2012) e, em *Anacardium othonianum* Rizzini, foi observado aumento no comprimento e na biomassa seca das mudas (Cabral et al., 2012).

Os microrganismos que habitam o interior das plantas sem causar danos visíveis ou alterações morfológicas no seu hospedeiro são conhecidos como microrganismos endofíticos (Kogel et al., 2006; White e Bacon, 2012). Em geral, microrganismos endofíticos penetram os órgãos vegetais por aberturas naturais como estômatos e hidatódios, ou ainda através de feridas. Outras portas de entrada são aberturas causadas por insetos e até mesmo pelas estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios. Também pode ocorrer penetração ativa de endofíticos por produção de enzimas ou estruturas que facilitam o processo (Qin et al., 2012).

Possuem a capacidade de fornecer benefícios ao hospedeiro, como a solubilização de fosfato insolúvel por meio da produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e a redução do pH, ocorrendo a dissociação do fosfato, tornando-o

disponível para as plantas (Pelzer et al., 2011). Além de sintetizar fitormônios e fornecer ao vegetal, o ácido indolacético (AIA) pode ser sintetizado por duas vias, uma em que o triptofano é utilizado como precursor (Contreras et al., 2010) e a via independente de triptofano (Kochar e Srivastava, 2012).

Um grupo de fungos endofíticos que possui hifas marrons e a formação de microesclerócio é conhecido como *dark septate* (DSE) e atuam fornecendo algumas vantagens as plantas, porém, o benefício da associação com os DSE ainda não é totalmente esclarecido e acredita-se que os benefícios que este grupo fornece a planta seriam similares aos FMA (You et al., 2012).

O *A. othonianum* Rizzini é uma Anacardiaceae nativa do Cerrado brasileiro, popularmente conhecida como caju-de-árvore-do-cerrado, que possui grande importância regional, ao ser explorada como espécie frutífera e medicinal (Caramori et al., 2004). O caju-de-árvore-do-cerrado distingue-se das demais espécies, *A. humile*, *A. nanum* e *A. corymbosum*, pelo porte arbóreo, podendo atingir até 6,0 m de comprimento (Vieira et al., 2006).

O pseudofruto desta espécie pode ser consumido na forma de sucos, licores, geleias, rapaduras, sorvetes, produtos cristalizados e aguardentes (Correa et al., 2008). O consumo do cajuzinho na alimentação foi reforçado, pela comprovação dos altos valores nutricionais (Silva et al., 2008). Porém, o crescimento lento de suas mudas vem restringindo seu cultivo comercial, tornando o seu aproveitamento limitado a pequenos produtores e a exploração extrativista (Vieira et al., 2006).

Contudo estudos sobre a comunidade microbiana que se associam às raízes desta espécie são inexistentes, portanto, objetivou-se com este trabalho caracterizar as populações de fungos endofíticos cultiváveis e seus traços funcionais, associados às raízes de *A. othonianum* Rizzini.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material vegetal**

Três plantas jovens de aproximadamente 50 cm de caju-de-árvore-do-cerrado foram coletadas no verão -março de 2012 - no município de Montes Claros de Goiás – GO (S 16°08' de latitude e W 51°17' de longitude, 592m de altitude).

As plantas foram integralmente retiradas do solo com o uso de um escavador manual, cuidadosamente manuseado para impedir danos à raiz e preservar grande

quantidade do solo rizosférico. Em seguida foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano – Câmpus Rio Verde para processamento.

## **2.2 Observação de associação entre fungos e raízes de caju-de-árvore-do-cerrado**

Amostras de raízes previamente mantidas em álcool 70% foram despigmentadas pelo método de Koskey e Gemma (1989), modificado. As raízes foram imersas em KOH (2%), autoclavadas a 121°C, por 20 minutos e transferidas para uma nova solução de KOH (2%) por 24 horas, à temperatura ambiente, seguido de imersão em solução alcalina de peróxido de hidrogênio amoniacal (NH<sub>4</sub>OH 0,5% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5% em água) por 60 minutos.

A coloração das raízes foi realizada com o corante azul de tripano (0,05%) em lactoglicerol (Phillips e Heyman, 1970), e 10 lâminas para microscopia foram confeccionadas com três fragmentos de raízes, permitindo a visualização das estruturas em microscópio Leica DM500, com câmera Leica ICC 50 adaptada ao software LAZ EZ, versão 1.8.0, de forma a classificá-las de acordo com literatura especializada (Petrini, 1986; Peterson et al., 2004).

## **2.3 Isolamento, caracterização genética e identificação molecular das linhagens de fungos endofíticos cultiváveis**

As raízes das plantas de caju-de-árvore-do-cerrado foram lavadas em água corrente, posteriormente foram imersas em água de torneira com detergente neutro e agitadas por 5 minutos. Em seguida, foram enxaguadas com água destilada até a retirada completa de todo o detergente.

Em fluxo laminar, as raízes foram imersas em álcool (70%) por um minuto; hipoclorito de sódio (2,5%) de cloro ativo três minutos e álcool (70%) por 30 segundos, posteriormente enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada e o excesso de umidade retirado com papel filtro esterilizado. Como controle do processo de assepsia, foram coletados 500 µL da água utilizada no enxágue final das amostras, para inoculação em tubos contendo meio de cultura.

Sete fragmentos de raízes de aproximadamente um cm foram cortados com auxílio de pinça e tesoura, e distribuídos superficialmente em 12 placas de Petri contendo meio BDA (Infusão de 200 g de batata, dextrose 20 g, ágar 15 g e 1000 mL água) suplementado com 100 mg.L<sup>-1</sup> de Clorofenicol<sup>®</sup>, e em 9 placas de Petri com meio AN (extrato de carne 3 g, peptona 5 g e ágar 15 g). Ao total foram analisados 84

fragmentos em meio BDA e 63 fragmentos em meio AN, oriundos de cada indivíduo de caju-de-árvore-do-cerrado.

Os microrganismos que cresceram nos fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo BDA e os fungos purificados por repicagem do micélio em placas contendo meio sólido. Os fungos foram agrupados em linhagens por características morfológicas de acordo com a cor do micélio, textura e extensão de crescimento micelial e, em seguida, mantidos a 2 a 8 °C em vidros de penicilina contendo BDA.

Um representante de cada morfotipo foi utilizado para a extração do DNA genômico, que foi realizada com kit de extração Miniprep, seguindo recomendações do fabricante (Axygen biosciences, USA). A caracterização genética foi realizada com o uso de marcadores moleculares IRAP-PCR (Inter-Retrotransposon amplified polymorphisms) e ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat).

O marcador IRAP-PCR, no qual foram utilizados os primers CL IRAP 1 (5' – CGT ACG GAA CAC GCT ACA GA - 3') e CL IRAP 4 (5' – CTT TTG ACG AGG CCA TGC - 3') (Santos et al., 2012), com volume da reação de 25 µL e nas condições de amplificação de desnaturação inicial 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 94 °C por 0,40 minutos, anelamento 44 °C 0,40 minutos, síntese 72 °C 2 minutos e síntese final: 72 °C por 10 minutos.

Para o marcador ISSR-PCR, no qual foi utilizado o primer BH1 (5' - GTG GTG GTG GTG GTG - 3') (Smith et al., 2003), com volume de reação de 25 µL e as condições de amplificação foram realizadas com, desnaturação inicial 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 94 °C por 1 minuto, anelamento 50 °C 2 minutos, síntese 72 °C 2 minutos e síntese final: 72 °C por 10 minutos.

Os produtos das amplificações IRAP-PCR e ISSR-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%. Os tamanhos dos amplificadores foram determinados com marcador 123pb DNA Ladder (Sigma-Aldrich, Inc.). As imagens foram salvas em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia, Brasil) para posterior análise.

A avaliação da diversidade foi obtida por inspeção visual do gel, considerando todas as bandas visíveis. O perfil de amplificação foi transformado em uma matriz binária com os valores: 0: ausência e 1: presença para cada amplicon. A similaridade dos dados foi calculada através do Coeficiente de Jaccard (Sneath e Sokal, 1973). O agrupamento, utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with

Arithmetical Average), foi obtido baseando na matriz de similaridade com o *software* NTSys v.2.1 (ROHLF, 2001). Um nível de 75% de similaridade mínima entre os isolados foi considerado para definição da Unidade Taxonômica Operacional (OTU) (Torres et al, 2008).

A identificação molecular dos isolados foi realizada pelo sequenciamento parcial do espaçador interno transcrito (ITS) da região rDNA de representantes de cada OTU. Os oligonucleotídeos ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS 5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White et al. 1990) foram utilizados para amplificação da região intergênica. O volume de reação foi de 25 µL e as condições de amplificação foram realizadas como segue: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 58 °C por 35 segundos e 72 °C por 1,20 minutos, e o passo final de alongamento de 72 °C por 10 minutos em um AMPLITHERM Thermal Cyclers. Os produtos de amplificação foram purificados (Dunn e Blattner, 1987) e quantificados por eletroforese em gel de agarose 1,2%.

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger com o Kit Big Dye no ABI3100 Applied Biosystem. As sequências foram comparadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com sequências conhecidas, por uma pesquisa de similaridade via Blastn (Altschul et al., 1990).

A frequência relativa das espécies encontradas foi calculada dividindo o número de isolados de uma espécie pelo número total de isolados. O índice de diversidade de Shannon (H') foi calculado de acordo com Kumar e Hyde (2004).

## **2.4 Traços funcionais das espécies endofíticas**

Um total de 12 isolados endofíticos obtidos de *A. othonianum*, foram utilizadas para avaliação da síntese de ácido indolacético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio.

### **2.4.1 Solubilização de Fosfato de Cálcio, Ferro e Alumínio**

Os isolados fúngicos foram crescidos em meio BDA (infusão de 200 g de batata, dextrose 20 g e ágar 15 g) por três dias a 30 °C. Posteriormente discos de micélio de 5 mm, foram inoculados em triplicata, em vidros de penicilina contendo 9 mL de meio GELP básico (glicose, extrato de levedura e peptona) com três diferentes fontes de fosfato (5 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de cálcio - CaHPO<sub>4</sub>, 1 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de ferro - FePO<sub>4</sub>, 2 g.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> de fosfato de alumínio -  $\text{AlPO}_4$ ). Em seguida mantidos sob agitação constante com o auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712<sup>®</sup>) em rotação a 90 rpm, por 72h, a 30 °C. A solubilização de fosfato foi avaliada por meio do método colorimétrico descrito por Braga e DeFelipo (1974).

A solubilização de fosfato pelos fungos foi determinada utilizando a equação da curva padrão e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott (5%).

#### **2.4.2 Síntese de ácido indolacético (AIA)**

Os 12 isolados fúngicos foram crescidos em meio BDA por três dias a 30 °C. Posteriormente, discos de micélio de 5 mm, em triplicata, foram inoculados em vidros de penicilina contendo 5 mL de meio BD (Infusão de 200 g de batata, dextrose 20 g e 1000 mL água) suplementado com 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de triptofano.

Os isolados ficaram sob agitação constante com o auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712<sup>®</sup>) em rotação a 90 rpm, por 72h, a 30 °C. A produção de AIA foi avaliada por meio do método colorimétrico, descrito por Gordon e Mitchell (1951).

A síntese de AIA dos fungos foi determinada utilizando a equação da curva padrão e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott (5%).

### **3. Resultados e Discussão**

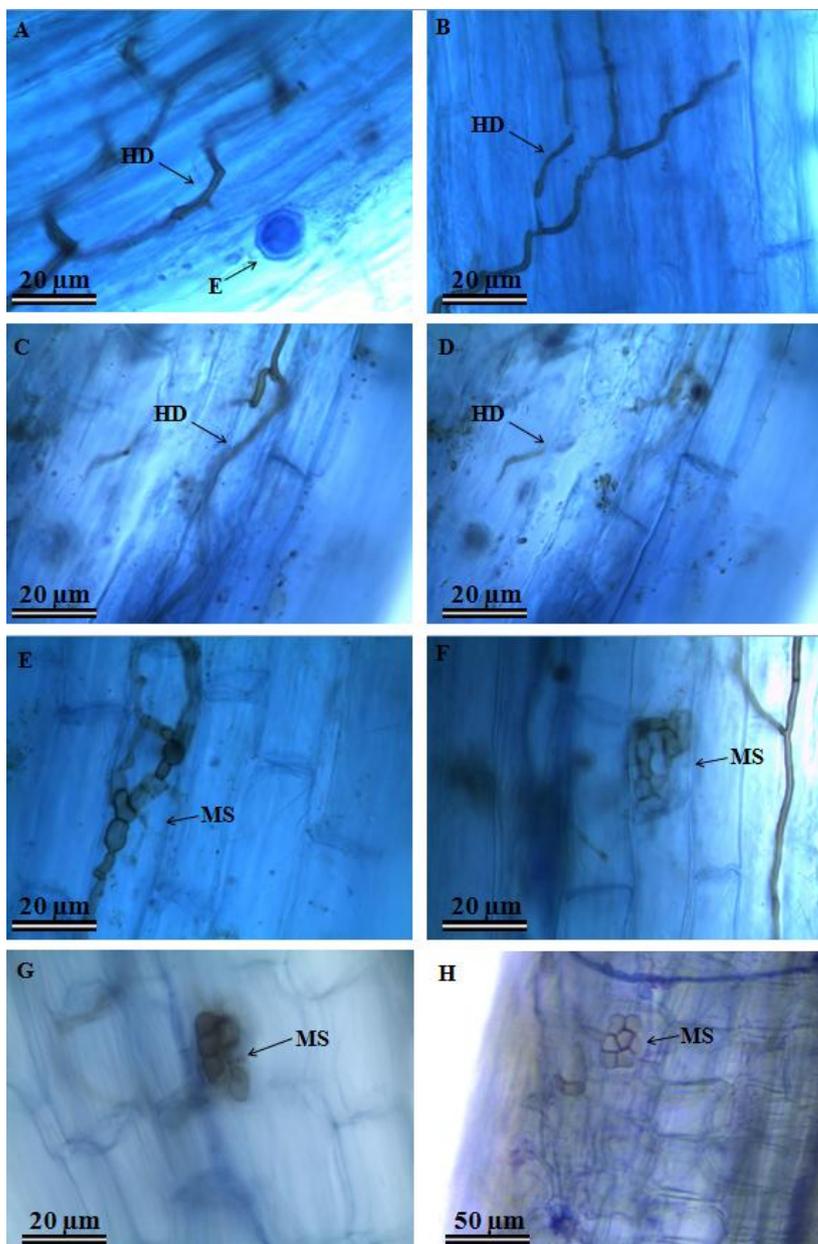
#### **3.1 Observação de associação entre fungo e raízes de caju-de-árvore-do-cerrado**

Na análise microscópica das raízes de *A. othonianum* não se observou alterações morfológicas nem sintomas de doenças nas raízes coletadas para este trabalho. Foram observados dois grupos de microrganismos colonizando as raízes desta espécie arbórea, confirmando que o método de preparação das raízes foi eficiente para esta espécie.

O primeiro grupo encontrado foi os fungos endofíticos chamados de *dark septate* (DSE). Foi possível esta classificação pela observação de hifas septadas na coloração marrom (Figura 1A-D) e estruturas de microesclerócios (Figura 1E-H) que são típicas deste grupo.

Os fungos possuem crescimento inter e extracelular e, como estratégia de colonização intercelular, a hifa diminui o seu diâmetro ao penetrar a parede celular, conseqüentemente, a região que está na porção extracelular da hifa dilata-se, e possibilita determinar o local exato da colonização (Figura 1C-D).

Foi observado diferentes estádios de desenvolvimento do microesclerócio. Segundo Wu (2009), o microesclerócio pode ser uma estrutura responsável por armazenar substâncias especiais ou ainda como estrutura de propágulo.



**Figura 1.** Estruturas de fungos endofíticos *dark septate* em raízes de *Anacardium othonianum* Rizzini, coltado em Montes Claros de Goiás, GO. Legenda: HD hifas de *dark septate*, MS microesclerócio.

A coloração escura dos fungos *dark septate* está relacionada à capacidade de aumentar a rigidez da parede celular das células do fungo, bem como, a resistência do fungo contra a irradiação, temperatura elevada e a dessecação (Zhan et al., 2011), visto

que estes microrganismos possuem alta habilidade de colonizar ambientes desérticos ou áridos (Wu et al.,2009).

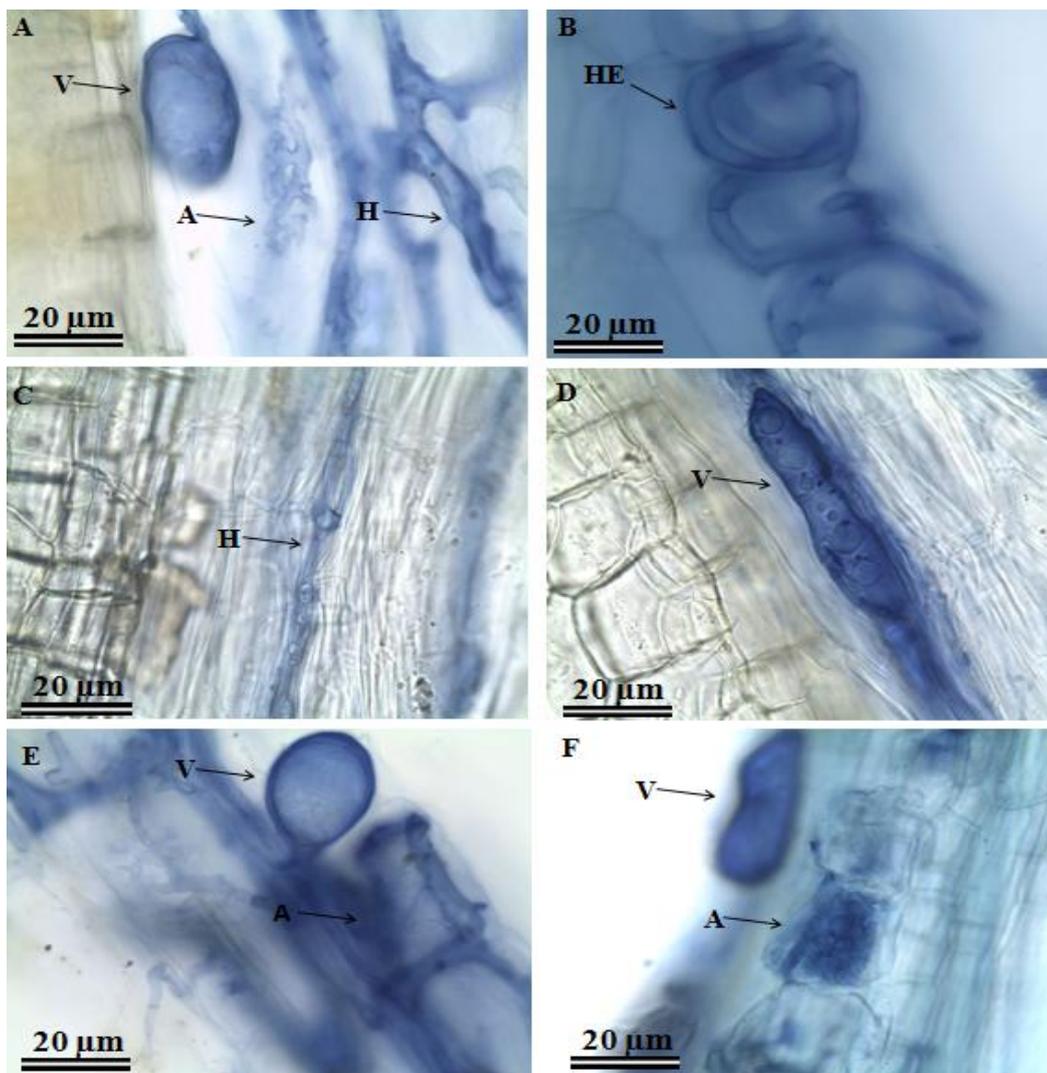
O segundo grupo fúngico encontrado foram os FMA, grupo caracterizado por hifas sem septo e a presença de estruturas características como a vesícula (V) e o arbúsculo (A) (Figura 2A).

De acordo com Smith e Smith (2007), a presença de arbúsculos típicos, resultante da intensa ramificação no interior das células do córtex do hospedeiro, é característica de colonização Arum, enquanto a presença abundante de hifas enoveladas, no interior das células do córtex, é característica do padrão de colonização Paris. A observação simultânea dos dois tipos de padrão de colonização micorrízica – Arum e Paris, considerando que o tipo de colonização é influenciado pela identidade do fungo simbiote, neste caso pode haver mais de uma espécie fúngica colonizando as raízes.

As hifas do FMA são coradas com o corante azul de tripano e crescem intracelularmente (associação Arum), formando a chamada hifa enovelada, que envolve a célula internamente tomando seu formato à medida que a parede celular vegetal limita seu crescimento (Figura 2B), ou entre as células vegetais (Figura 2C) permitindo a associação do tipo Paris. Portanto, a morfologia da endomicorriza *A. othonianum* é intermediária.

Os FMA encontrados colonizando as raízes de caju-de-árvore-do-cerrado têm a capacidade de armazenar lipídeos no interior das próprias hifas (Figura 2C) ou em estruturas especializadas chamadas de vesículas (Figura 2D). Foram encontradas vesículas entre as células vegetais (Figura 2D) e internamente as células (Figura 2A, 2E e 2F), com tamanho e forma variável.

A presença de arbúsculos foi confirmada pela observação de hifas que se ramificam formando uma rede de hifas menores e, em maior número, no interior das células do vegetal permitindo constante comunicação entre o fungo e o vegetal (Figura 2A, 2E e 2F).



**Figura. 2** Estruturas de fungos micorrízicos colonizando raízes de *Anacardium othonianum* Rizzini, coletado no município de Montes Claros de Goiás. A: Vesícula, arbúsculo e hifas. B: Hifas enveladas. C: Hifas contendo gotículas de lipídios. D: Vesícula intercelular armazenando lipídios. E: Vesícula e arbúsculo intracelular. F: Vesícula alongada e arbúsculo bastante ramificado. Legenda: A (arbúsculos), V (vesículas), H (hifas), HE (hifas enveladas).

As espécies do Cerrado de maneira geral têm seu crescimento limitado pelas condições edafoclimáticas da região (Pinto et al., 2011) e várias estratégias de sobrevivência são usadas, sendo uma delas é a associação com FMA (Zhang et al., 2011) ou endofíticos (Wu et al., 2009). Isto proporciona vantagens ao vegetal em virtude dos microrganismos competirem com patógenos, aumentarem sua área de

absorção de água e nutrientes no solo como o P, além de, fornecer alguns fitormônios (Simard e Durall, 2004; You et al., 2012).

A simbiose micorrízica ocorre tendo em vista a capacidade dos fungos de aumentar a disponibilidade de nutrientes e água, explorando regiões mais profundas que as próprias raízes, e isto pode ser decisivo no estabelecimento e sobrevivência da espécie (Wu et al., 2009). O solo no qual o vegetal se estabelece é outro fator determinante para esta relação, pois em solos com baixa fertilidade, especialmente em teores de cálcio (Ca), ferro (Fe) e potássio (K) pouco solúveis a simbiose será estimulada (Uma et al., 2012; Sharma e Jha, 2012).

Os FMA podem colonizar espécies lenhosas ou herbáceas (Zang et al., 2011; Vitorino et al., 2012), e estudos mostram que podem colonizar 64% do sistema radicular de *Ficus sp.* (Uma et al., 2012), e várias famílias já são conhecidas pela interação com FMA (Acanthaceae, Asclepidaceae, Amaranthaceae, Asteraceae, Caesalpinaceae, Chenopodiaceae, Commelinaceae, Cyperaceae, Labiatae, Nyctaginaceae, Poaceae, Rutaceae, Solanaceae, Umbellifereae, Verbanaceae, Lamiaceae, Phytolaccaceae, Fabaceae, Bignoniaceae, Moraceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Melastomataceae e Myrsinaceae) (Detmann et al., 2008; Silva et al., 2009; Sharma e Jha, 2012; Vitorino et al., 2012).

A colonização micorrízica na família Anacardiaceae foi relatada por Proborini (2013), ao estudar a morfologia característica de esporos de FMA isolados da rizosfera de *A. occidentale* L.

A dupla colonização de FMA e DSE em plantas indica a dinâmica da comunidade que coloniza essas raízes, reforçando a complexidade desta interação. Já foram relatadas a simbiose com os dois grupos fúngicos nas seguintes espécies do Cerrado *Hyptis marruboides*, *Alibertia edulis*, *Aeschynomene paniculata*, *Chamaecrista desvauxii*, *Chamaecrista nictitans*, *Coccocypselum sp.*, *Eugenia dysenterica*, *Miconia albicans*, *Myrsine guianensis*, *Palicuria sp.*, *Platypodium elegans* pois (Detmann et al., 2008; Vitorino et al., 2012), e em *Centilla asiatica* e *Leuca plukenitti* (Sharma e Jha, 2012), espécies nativas da Índia.

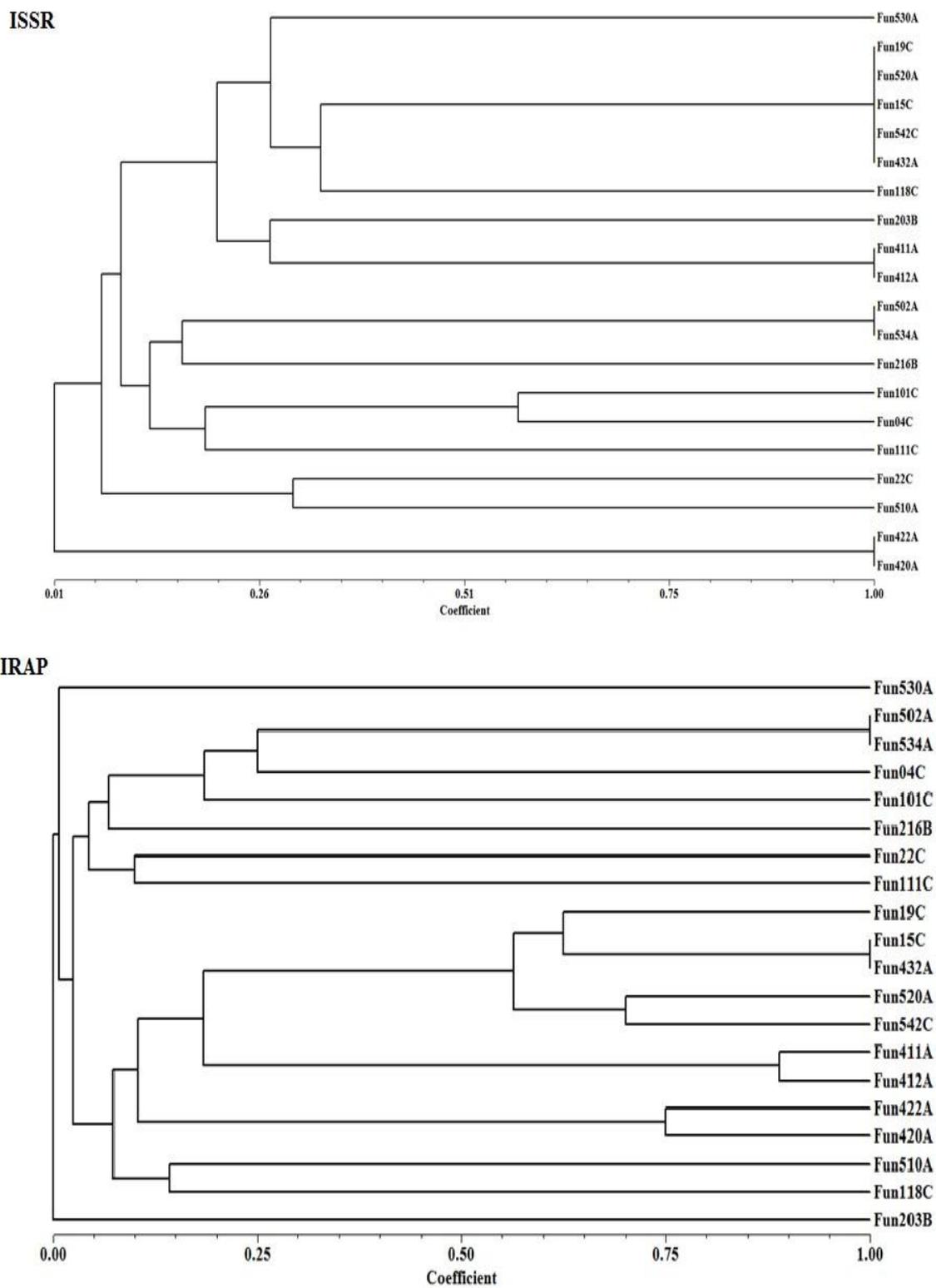
Até o presente momento, a associação e os tipos de fungos colonizando internamente as raízes de *A. othonianum* não eram conhecidas. Esse hospedeiro é capaz de abrigar colonização concomitante de fungos DSE e FMA. São necessários estudos mais aprofundados para compreender a dinâmica desta relação entre estes grupos microorganismos e o hospedeiro.

### **3.2 Isolamento, caracterização genética e identificação molecular das linhagens de fungos endofíticos cultiváveis**

Foram obtidos 67 isolados de fungos endofíticos dos fragmentos de raízes de caju-de-árvore-do-cerrado, sendo 35 e 32 linhagens provenientes dos meios AN e BDA, respectivamente. Após o crescimento das linhagens, eles foram agrupados em 20 grupos morfológicos, diferenciados por características macroscópicas - borda, tipo e coloração do micélio, e microscópicas – diferenciação de estruturas reprodutivas.

Por análise de marcador molecular, observou-se resultado distinto entre os marcadores utilizados, pelo marcador ISSR-PCR (“Inter-Simple Sequence Repeats” ou intermicrossatélites) foram observadas 13 OTU’s, sendo 9 por perfis únicos e 4 por grupos de isolados.

Utilizando o marcador IRAP-PCR (“Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphisms”) detectou-se 17 OTU’s, sendo 15 formados por perfis únicos e 2 formados por grupos de isolados (Figura 3).



**Figura 3.** Similaridade entre os morfotipos de fungos de *Anacardium othonianum* Rizzini, coletado em Montes Claros de Goiás, GO pelo marcador ISSR e IRAP. Rio Verde – GO, 2013.

Os sistemas de marcadores moleculares baseados em RTNs (retrotransposons) de repetições terminais longas (LTRs) exploram o polimorfismo do DNA genômico resultante de fenômenos de inserção entre dois RTNs muito próximos, no caso do marcador IRAP (Schulman et al., 2004) Isso reflete na separação em nível de indivíduo, sendo um marcador eficiente e muito preciso, neste trabalho o IRAP revelou 17 OTU.

O ISSR explora a ubiquidade dos microssatélites nos genomas e consiste na amplificação de regiões entre dois microssatélites adjacentes, inversamente orientados, tornando os marcadores multilocus (Smith e Bateman, 2002). Foi observado que este marcador originou 13 OTU, sendo considerado um marcador mais robusto.

A análise molecular revelou 10 espécies fúngicas, *Penicillium kloeckeri*, *Eupenicillium shearii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium oxysporum*, *Periconia macrospinoso*, *Cladosporium cladosporioides*, *Bionectria ochroleuca*, *Phomopsis lagerstroemiae*, *Phomopsis asparagi* e *Penicillium pinophilum*, uma classe *Agaricomycetes* sp., e um gênero *Diaporthe* sp.

*Phomopsis lagerstroemiae* (Fun520A) foi a espécie mais frequente (44,8%) seguido de *Periconia macrospinoso* (Fun502A) (16,4%), *Agaricomycetes* sp. (Fun04C) (10,4%), *Cladosporium cladosporioides* (Fun422A) (7,5%) e *Phomopsis asparagi* – (Fun530A) (6,0%). As demais espécies foram consideradas raras, possuindo frequência inferior a 3% (Sun et al., 2012) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Identificação dos isolados fúngios endofíticos isolados de *Anacardium othonianum*, coletados no município de Montes Claros de Goiás.

Isolados	GenBank	% ID	Nº acesso no GenBank	Frequência relativa %	
Fun530A Fun219B Fun417A Fun527A	<i>Phomopsis asparagi</i>	99	JX049385	5,970149254	
Fun520A Fun15C Fun19C Fun28C Fun38C Fun406A Fun407A Fun414A Fun415A Fun425A Fun431A Fun432A Fun503A Fun506A Fun513A	Fun517A Fun522A Fun520A Fun521A Fun523A Fun524A Fun526A Fun529A Fun542A Fun544A Fun555A Fun557A Fun558A Fun559A Fun560A Fun564A	<i>Phomopsis lagerstroemiae</i>	98	AY622994	44,7761194
Fun118C Fun14C	<i>Penicillium pinophilum</i>	98	AB455516	2,985074627	
Fun203B	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	HQ328030	1,492537313	
Fun411A Fun412A	<i>Bionectria ochroleuca</i>	98	HQ607798	2,985074627	
Fun111C	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	98	FJ765021	1,492537313	
Fun307B Fun308B Fun29C Fun121C Fun127C	Fun502A Fun405A Fun410A Fun508A Fun534A Fun305B	<i>Periconia macrospinoso</i>	99	JN859364	16,41791045
Fun04C Fun24C Fun26C Fun37C Fun101C Fun102C Fun302B	<i>Agaricomycetes sp.</i>	91	JF288547	10,44776119	
Fun216B	<i>Penicillium kloeckeri</i>	98	HM469393	1,492537313	
Fun22C	<i>Eupenicillium shearii</i>	99	JQ863221	1,492537313	
Fun510A Fun36C	<i>Diaporthe sp.</i>	98	EF488448	2,985074627	
Fun420A Fun421A Fun429A Fun213B	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99	JX230994	7,462686567	

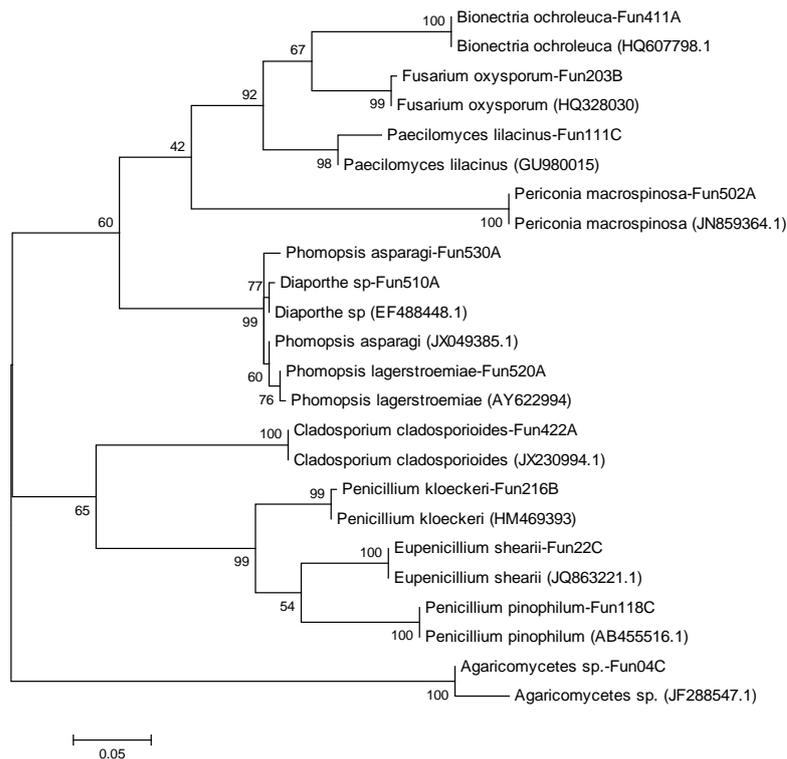
Segundo Wang et al (2005) o filo Basidiomycota raramente é isolado como endófito, em *A. othonianum* foram isolados sete representantes (*Agaricomycetes sp.*).

Contudo o filo Ascomycota representou 90% do total dos indivíduos, sendo encontrados três classes: Sordariomycetes (85%), Dothimycetes (8,4%) e Euromycetes (6,6%).

O valor de diversidade de Shannon  $H'$  encontrado nas populações de fungos endofíticos de *A. othonianum* foi de 1,82. Ao estudar folhas e caules em áreas desérticas na China, Sun et al. (2012) obtiveram valores para o índice de Shannon variando 0,29-4,78, e Bezerra et al. (2013) encontraram valores totais de 2,99 ao estudar cactus *Cereus jamacaru* DC, na floresta tropical seca do Brasil. Costa et al. (2012) encontraram Índice de Diversidade de Shannon na estação seca de 1.035, e um pouco menor no período chuvoso ( $H' = 1,026$ ) ao estudar isolados endofíticas de Manguezal no nordeste do Brasil.

Embora a taxonomia morfológica contribua muito para a elucidação da diversidade de fungos endofíticos, a utilização de métodos de identificação molecular tem se mostrado excelente ferramenta para a identificação de morfoespécies (Bensch et al., 2012).

Pela análise de máxima verossimilhança da análise de sequências ITS, foi possível observar um agrupamento por similaridade entre as espécies de fungos endofíticos isolados (Figura 4).



**Figura 4.** Análise molecular filogenética pelo método de máxima verossimilhança, entre isolados fúngicos endofíticos de *Anacardium othonianum* Rizzini, coletado no município de Montes Claros de Goiás, Rio Verde – GO, 2013.

O primeiro grupo é composto por apenas *Agaricomycetes sp* representando o filo Basidiomycota. O segundo grupo classificado como o filo Ascomycota, origina dois sub grupos, um composto por *Cladosporium cladosporioides* representando a classe Dothiomycetes, neste mesmo grupo, porém em condições mais derivadas se encontram as espécies *Penicillium kloeckeri*, *Eupenicillium shearii* e *Penicillium pinophilum* que compõem a classe Eutotiomycetes. No outro grupo do filo Ascomycota estão os representantes da classe Sordariomycetes: *Phomopsis lagerstroemiae*, *Phomopsis asparagi*, *Diaporthe sp* compõem um subgrupo, seguido de *Periconia macrospinososa*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium oxysporum* e *Bionectria ochroleuca*.

Ao estudar a comunidade de fungos endofíticos das plantas de regiões desérticas da China, Sun et al. (2012) descreveram o isolamento de espécies de *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium* gêneros comuns aos descritos neste trabalho, um indicativo que estas espécies são comuns a hospedeiros que habitam locais de intensa luminosidade e estresse hídrico.

Espécies do gênero *Penicillium* foram descritas por Ge et al. (2008) e Wubsheta et al. (2013). *Penicillium pinophilum* é conhecido também por ser um fungo saprofítico que degrada celulose (Maciel et al., 2012), porém, acredita-se que possui efeito sinérgico com FMA, estimulando o estabelecimento e a esporulação do FMA (Quilliam e Jones, 2010).

*Diaporthe* é um gênero endofítico conhecido por produzir enzimas que atuam na inibição do metabolismo de patógenos (Prada et al., 2009; Anaya et al., 2013) e foi observado por Sebastianes et al. (2013) em mangueiras nativas do Brasil

Apesar da espécie *Fusarium oxysporum* ser tradicionalmente reconhecida como fitopatogênica (Maciel et al., 2012) diferentes trabalhos demonstram a sua capacidade endofítica (Onofre et al., 2013; Chen et al., 2013). Já foi relatada a produção de diversas enzimas que degradam a parede celular como proteases, celulasas e quitinases e a produção de substâncias como sideróforos por este fungo (Xing et al., 2010; Zhao et al., 2010; Vieira et al., 2012).

Já *Phomopsis* são fungos endófitos que podem promover o crescimento vegetal, sendo capaz de produzir compostos que aceleram a decomposição de resíduos, liberando nutrientes no solo e induzem a planta a melhorar sua capacidade defensiva (Chen et al., 2013).

*Cladosporium* foi descrito por Yang et al. (2013) como espécie endofítica isolada de *Aconitum leucostomum*, *Bionectria* foi isolada de pimenta na Coreia (Paul et al., 2013), *Eupenicillium* isolado na China de folhas de *Murraya paniculata* (Wang et al., 2012). A classe Agaricomycetes foi descrita por Brum et al., (2012) como espécie endofítica que possui capacidade de controlar espécies patogênicas de fungo.

*Paecilomyces lilacinus* é um fungo amplamente utilizada comercialmente como inoculante contra Nematoides, (bioativo Bioact WG<sup>®</sup> - Prophyta) (Berg, 2009).

*Periconia macrospinosa* é uma espécie endofítica descrita por Mandyam et al. (2012) que se associa a gramíneas nativas de pradaria do leste de Kansas no Estados Unidos da América. Esta espécie é caracterizada pela presença de hifas septadas na coloração marrom e estruturas de microesclerócios, típicas do grupo de DSE.

O valor de diversidade de Shannon H' encontrado nas populações de fungos endofíticos de *A. othonianum* foi de 1,82, valor considerável para regiões edafoclimáticas como a do Cerrado Brasileiro. Ao estudar folhas e caules em áreas desérticas na China, Sun et al. (2012) obtiveram valores para o índice de Shannon

variando 0,29-4,78, e Bezerra et al. (2013) encontraram valores totais de 2,99 ao estudar cactus (*Cereus jamacaru* DC) no Brasil. Costa et al. (2012) encontraram índice de diversidade de Shannon na estação seca de 1,03, e um pouco menor no período chuvoso ( $H' = 1,02$ ) ao estudar isolados endofíticos de Manguezal no nordeste do Brasil.

### 3.3 Traços funcionais das espécies endofíticas

Os 12 fungos testados foram capazes de solubilizar fosfato insolúvel. O fosfato de cálcio foi a fonte de fosfato mais solubilizada, em que *P. kloeckeri* ( $4,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), *E. shearii* ( $3,9 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *P. lilacinus* ( $3,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram os microrganismos que mais solubilizaram esta fonte de fosfato, seguido por *F. oxysporum* ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), *P. macrospinoso* ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), *C. cladosporioides* ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *Agaricomycetes sp.* ( $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Para fosfato de ferro *Agaricomycetes sp.* ( $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *B. ochroleuca* ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) seguidos por *P. lilacinus* ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), *C. cladosporioides* ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), *F. oxysporum* ( $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), *Diaporthe sp.* ( $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *E. shearii* ( $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiveram as maiores respostas.

*P. pinophilum* teve as menores respostas para solubilização de fosfato de cálcio ( $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ferro ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Não houve diferença entre os microrganismos testados para solubilização de fosfato de alumínio (Tabela 2).

**Tabela 2.** Solubilização *in vitro* de fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>), ferro (FePO<sub>4</sub>) e alumínio (AlPO<sub>4</sub>) por fungos endofíticos de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizzini). Rio Verde – GO, 2013.

Espécies	Fosfato dissociado (mg L <sup>-1</sup> )		
	CaHPO <sub>4</sub>	FePO <sub>4</sub>	AlPO <sub>4</sub>
<i>Penicillium kloeckeri</i> Fun216B	4,1 <sup>Z</sup> Aa	1,0 Cb	0,9 Ab
<i>Eupenicillium shearii</i> Fun22C	3,9 Aa	1,2 Bb	0,6 Ac
<i>Paecilomyces lilacinus</i> Fun111C	3,7 Aa	1,5 Bb	1,0Ab
<i>Fusarium oxysporum</i> Fun203B	3,2 Ba	1,4 Bb	0,6 Ac
<i>Periconia macrospinosa</i> Fun502A	3,2 Ba	0,8 Cb	0,6 Ab
<i>Cladosporium cladosporioides</i> Fun422A	3,2 Ba	1,5 Bb	0,5 Ac
<i>Agaricomycetes sp.</i> Fun04C	3,1 Ba	2,2 Ab	1,2 Ac
<i>Bionectria ochroleuca</i> Fun411A	2,8 Ca	2,0 Ab	1,3 Ac
<i>Phomopsis lagerstroemiae</i> Fun520A	2,7 Ca	0,7 Cb	0,5 Ab
<i>Diaporthe sp.</i> Fun510A	2,5 Ca	1,4 Bb	1,0Ab
<i>Phomopsis asparagi</i> Fun530A	2,3 Ca	0,9 Cb	0,8 Ab
<i>Penicillium pinophilum</i> Fun118C	1,4 Da	0,1 Db	0,5 Ab

<sup>Z</sup>Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

O P é considerado um macronutriente essencial ao crescimento e desenvolvimento vegetal, tendo em vista sua atuação estrutural, funcional e na transferência de energia (Ma et al., 2011). Alguns microrganismos têm papel importante no ciclo do P, sendo responsáveis pela sua hidrólise tornando-o disponível às plantas. Estes processos são mediados por enzimas e ácidos orgânicos (Yang et al., 2012).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato atuam sobre o fosfato insolúvel por meio de fosfatases, principalmente fosfatases ácidas, com a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos reduzindo o pH, obtendo então o fosfato disponível para as plantas (Pelzer et al., 2011; Ma et al., 2011).

Isolados endofíticos de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae), espécie nativa do Cerrado demonstraram capacidade de solubilização de fosfato, em especial três cepas, foram qualificadas como de potencial (Vitorino et al., 2012).

Os fungos endofíticos de *A. othonianum* sintetizaram AIA, em destaque *Fusarium oxysporum* (1,7 µg mL<sup>-1</sup>), seguido de *Bionectria ochroleuca* (0,3 µg mL<sup>-1</sup>),

*Periconia macrospinoso* (0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Phomopsis lagerstroemiae* (0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Penicillium kloeckeri* (0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *Eupenicillium shearii* (0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Produção *in vitro* de ácido indolacético (AIA) por fungos endofíticos de cajude-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizzini). Rio Verde – GO, 2013.

Espécies	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Fusarium oxysporum</i> Fun203B	1,7 A
<i>Bionectria ochroleuca</i> Fun411A	0,3 B
<i>Periconia macrospinoso</i> Fun502A	0,3 B
<i>Phomopsis lagerstroemiae</i> Fun520A	0,3 B
<i>Penicillium kloeckeri</i> Fun216B	0,2 B
<i>Eupenicillium shearii</i> Fun22C	0,1 B
<i>Phomopsis asparagi</i> Fun530A	0,1 C
<i>Penicillium pinophilum</i> Fun118C	0,1C
<i>Agaricomycetes sp.</i> Fun04C	0 C
<i>Diaporthe sp.</i> Fun510A	0 C
<i>Cladosporium cladosporioides</i> Fun422A	0 C
<i>Paecilomyces lilacinus</i> Fun111C	0 C

<sup>Z</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Isolados endofíticos de *Trichoderma* testados por Oliveira et al. (2012) e Badawi et al. (2011) foram capazes de produzir AIA *in vitro* e o uso do precursor L-triptofano proporcionou efeito positivo como indutor para a síntese deste fitormônio. Segundo Vitorino et al. (2012) 52% dos isolados endofíticos de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae), foram capazes de sintetizar AIA *in vitro*.

## 4 Conclusão

As raízes de *Anacardium othonianum* Rizzini estão associadas a fungos micorrízicos arbusculares e a dark septados.

Doze espécies endofíticas foram isoladas em *Anacardium othonianum* Rizzini, sendo que sete possuem capacidade de solubilização de fosfato e uma de sintetizar AIA.

#### 4. Referências Bibliográficas

ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, 403–410, 1990.

ANAYA, A. L.; SAUCEDO-GARCÍA A.; CONTRERAS-RAMOS, SILVIA. M.; CRUZ-ORTEGA, ROCÍO. **Plant-Mycorrhizae and Endophytic Fungi Interactions: Broad Spectrum of Allelopathy Studies. Allelopathy**. p. 55-80, 2013.

BADAWI, F. S. F.; BIOMY, A. M. M.; DESOKY, A. H. Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with Bradyrhizobium and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. **Annals of Agricultural Science**, p. 17-25, v. 56, 2011.

BENSCH K, BRAUN U, GROENEWALD JZ, CROUS PW. The genus Cladosporium. **Studies in Mycology**. n. 72, p.1–401, 2012.

BEZERRA, J. P. ; SANTOS, M. G. S. ; BARBOSA, R. N. ; SVEDESE, V. M. ; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S. GOMES, B. S. ; PAIVA, L. M. ; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. ; SOUZA-MOTTA, C. M. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, n. 60, p. 53–63, 2013.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 84, p. 11–18, 2009.

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. **Revista Ceres**, n. 113, v. 21, p. 73-85, 1974.

BRUM, M.C.P; ARAÚJO, W.L.; MAKI, C.S.; AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. (‘Niagara Rosada’) and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genetics and Molecular Research** n. 4, v. 11, p. 4187-4197, 2012.

CABRAL, J. S. R.; ASSIS, K. C. DE; SILVA, F. G.; SOUCHIE, E. L.; CARNEIRO, M. A. C. Seedlings of cashew trees of the Brazilian cerrado inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate–solubilizing microorganisms. **Agrociencia** n. 8, v. 46, 2012.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 253-259, 2004.

CHEN, Y.; WANG, H.; LI, L.; DAI, C. The potential application of the endophyte *Phomopsis liquidambari* to the ecological remediation of long-term cropping soil. **Applied Soil Ecology**. v. 67, p. 20–26, 2013.

CONTRERAS, A.R; DORANTES, A.R.; VILLAFÁN, S.M.; JIMÉNEZ, S.P.; TOVAR, A.R.; ZÚÑIGA, L.A.G. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* l. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo

contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. **Polibotánica**, v. 29, p.131-147, 2010.

CORREA, G. de C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R. da; CHAVES, L. J.; BORGES, J. D. Determinações Físicas em frutos e sementes de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), Cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) , visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**, n. 4, v. 24, p. 42-47, 2008.

COSTA, I. P. M. W.; MAIA, L. R.; CAVALCANTI, M. A. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. n. 3, v. 43, p. 1165-1173, 2012.

DETMANN, K.S.C. ; DELGADO, M. N. ; REBELLO, V.P.A. ; LEITE, T.S. ; AZEVEDO, A.A. ; KASUYA, M.C.M. ; ALMEIDA, A.M. . Comparação de métodos para a observação de fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo dark septate em espécies nativas de Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** (Impresso), n. 5, v. 32, p. 1883-1890, 2008.

DUNN, IAN S; BLATTNER, F. R. Charons 36 to 40: multienzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 6, p. 2677-2698, 1987.

GE, H. M., SHEN, Y., ZHU, C. H.; TAN, S. H.; DING, H.; SONG, Y. C. TAN, R. X. Penicidones A – C , three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, n. 2, v. 69, p. 571–576, 2008.

GORDON, S. A.; MITCHELL, D. T. Nutritional influences on the solubilization of metal phosphate by mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.*, 108, p. 947-954, 1951.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, n. 2, v. 44, p. 136–142, 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.

HELGASON, T. AND FITTER, A. H. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). **Journal of Experimental Botany**. n. 9, v. 60, p. 2465–2480, 2009.

KOCHAR, M.; SRIVASTAVA, S. (2012). Surface colonization by *Azospirillum* brasilense SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. **Journal of Basic Microbiology**. n. 2, v.52, p. 123–131, 2012.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – What decides? **Current Opinion in Plant Biology**. n. 4, v. 9, p. 358-368, 2006.

KOSKEY, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**. n. 4, v.92, p. 486-505, 1989.

KUMAR, D. S. S., HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, 17, 1994, 69–90. 2004.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; LUO, Y.; FREITAS, H. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants--effects on plant growth and Ni uptake. **Journal of hazardous materials**, v. 195, p. 230-237, 2011.

MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. DOS; LAZAROTTO, M. Deleção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de Angico- Vermelho. **Summa Phytopathol.**, n. 4, v. 38, p. 323-328, 2012.

MANDYAM, K.; FOX, C.; JUMPPONEN, A. Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. **Mycorrhiza**. n. 2, v. 22, p. 109-119, 2012.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, n. 3, v. 7, p. 149-155, 2012.

ONOFRE, S. B.; MATTIELLO, S. P.; SILVA, G. C. DA; GROTH, D.; MALAGI, I. Production of Cellulases by the Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum*. **Journal of Microbiology Research** . n.3, v. 4, p. 131-134, 2013.

PAUL, N. C.; DENG, J. X.; LEE, J. H.; YU, S. H. New Records of Endophytic *Paecilomyces inflatus* and *Bionectria ochroleuca* from Chili Pepper Plants in Korea. **Mycobiology**. v. 41, n. 1, p. 18-24, 2013.

PELZER, G. Q.; HELFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K.L.; SOUZA, G. R.; ZILLI, J. E.; PERIN, L. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**. v. 36 ,p. 95-103, 2011.

PETERSON, R.L.; MASSICOTTE, H.B.; MELVILLE, L.H. Mycorrhizas: Anatomy and Cel Biology. National Research Council Canada, p.173, 2004.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema, N. J.; Heuvel, L. van den (Ed.). **Microbiology of the phyllosphere**. p.87-175, 1986.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular árbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-160, 1970.

PICCOLI, P.; TRAVAGLIA, C.; COHEN, A.; SOSAL, L.; CORNEJO, P.; MASUELLI, R.; BOTTINI, R. An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A1 and A3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. **Plant Growth Regulation**, n. 2, v. 64, p. 207-210, 2011.

PINTO, J. R. R.; BORDINI, M. C.P.; PORTO, A. C.; SOUSA-SILVA, J. C. Princípios e técnicas usadas na recuperação de áreas degradadas. In: FAGG, C. W.; MUNHOZ, C.

B. R.; SOUSA-SILVA, J. C. Conservação de áreas de preservação permanente do Cerrado. Brasília; CRAD, 2011. p. 149-184.

PRADA, H.; A´VILA, L.; SIERRA, R.; BERNAL, A.; RESTREPO, S. Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre El endofito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. **Revista Iberoamericana de Micología**. n.26, v.3, p.198–201, 2009.

PROBORINI, M. W.; SUDANA, M.; SUARNA, W.; RISTIATI, N. P. Indigenous Vesicular Arbuscular Mycorrhizal (VAM) Fungo in Cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) Plantation of North East-Bali Island – Indonesia. *Journal of Biotechnology, Agriculture and Healthcare*. n 3, v. 3, p. 114-122, 2013.

QIN, S., CHEN, H., ZHAO, G., LI, J., ZHU, W., XU, L., JIANG, J., ET AL. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **Environmental Microbiology Reports** , n. 4, v. 5, p.522–531, 2012.

QUILLIAM, R. S.; JONES, D. L. Fungal root endophytes of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. **Mycorrhiza**. n. 5, v. 20, p. 341 -348, 2010.

ROHLF, F. J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: 2001.

SABOYA, R. DE C. C.; CHAGAS JR, A. F.; MONTEIRO, F. P. DOS R.; SANTOS, G. R.; ERASMO, E. A. L.; CHAGAS, L. F. B. Fungos micorrízicos arbusculares afetando a produção de mudas de pinhão-mansô na região sul do Estado de Tocantins, Brasil. **Revista Ceres**. n.1, v. 59, 2012.

SANTOS, L. T. P. Microbiota foliicola de *Salacia crassifolia*. Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

SANTOS, L. V. DOS; QUEIROZ, M. V. DE; SANTANA, M. F.; SOARES, M. A.; BARROS, E. G. DE; ARAÚJO, E. F. DE; LANGIN, T. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroC11 sequences. **World Journal of Microbiology Biotechnology**. n. 3, v. 28, p. 1087–1095, 2012.

SCHULMAN, A. H.; FLAVELL, A. J.; ELLIS, T. H. N. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. **Mobile Genetic Elements**. v. 260, p. 145-173; 2004.

SEBASTIANES, F. L. DE S.; ROMÃO-DUMARESQ, A. S.; LACAVA, P. T.; HARAKAVA, R.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, n. 3, v. 59, p. 153–166, 2013.

SHARMA, B. B.; JHA, D. K. Arbuscular mycorrhiza and dark septate fungal associations in medicinal and aromatic plants of Guwahati. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, n.1, v.2, p.212-222, 2012.

SILVA, M. R.; LACERDA, B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. de O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, n. 6, v. 8, p. 1790-1793, 2008.

SILVA, R. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; LEAL, L.; SILVA, A. S. da. Ocorrência de fungos micorrízicos em espécies florestais na região do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrocência**. v.15, n.1-4, p.65-70, 2009.

SIMARD, S. W., DURALL, D. M. Mycorrhizal networks?: a review of their extent , function , and importance. **Canadian Journal of Botany**, n. 1, n. 8, v. 82, p. 1140-1165, 2004.

SMITH, J. F.; BATEMAN, T. A. Genetic Differentiation of Rare and Common Varieties of *Eriogonum shockleyi* (Polygonaceae) in Idaho Using ISSR Variability. **Western North American Naturalist**. v. 62, n. 3, p. 316-326, 2002.

SMITH, F.A.; SMITH, S.E. Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? **Mycorrhiza**, n.17, p.375-393, 2007.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman, p. 573, 1973.

SUN Y, WANG Q, LU X, OKANE I, KAKISHIMA M. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. **Mycol Prog** n. 3, v. 11, p.781–790, 2012.

TORRES, S. P, GONZÁLEZ V, HINAREJOS R, TUSET JJ. Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). **Spanish Journal of Agricultural Research**, n.4, v.6, p. 650–660, 2008.

UMA, E.; SATHIYADASH, K.; LOGANATHAN, J.; MUTHUKUMAR, T. Tree species as hosts for arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte fungi. **Jornal of Florestry Research**. n.4, v.23, p. 641-649, 2012.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S.; SILVA, D. B. da; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 320, 2006.

VIEIRA MLA, HUGHES AFS, GIL VB, VAZ ABM, ALVES TMA, ZANI CL, ROSA CA, ROSA LH. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). **Canadian Journal of Microbiology**. n. 58, p. 54–66, 2012.

VITORINO, L. C.; SILVA, F. G.; SOARES, M. A.; SOUCHIE, E. L.; LIMA, W. C. The isolation and characterization of endophytic microorganisms from *Hyptis marrubioides* Epling roots **African Journal of Biotechnology** v. 11, p. 12766-12772, 2012.

VITORINO, L. C., SILVA, F. G., SOARES, M. A., SOUCHIE, E. L., COSTA, A. C.; LIMA, W. C. Solubilization of calcium and iron phosphate and in vitro production of

Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). **International Research Journal of Biotechnology**. v. 3, n.4, p. 47-54, 2012.

WANG Y, GUO LD, HYDE KD. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. **Fungal Divers** v. 20, p. 235–260, 2005.

WANG, Y.; XUE, F.; WU, Y.; XUE, Y.; ZHENG, Y. Development of macrolide lactone antibiotic brefeldin A fermentation process with *Eupenicillium brefeldianum* ZJB082702. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, n. 3, v. 114, p. 262–267, 2012.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322, 1990.

WHITE JF, BACON CW. The secret world of endophytes in perspective. **Fungal Ecol** n.3, v.5, p. 287–289, 2012.

WU, Y.; LIU, T.; HE, X. Mycorrhizal and dark septate endophytic fungi under the canopies of desert plants in Mu Us Sandy Land of China. **Frontiers of Agriculture in China**. n. 2, v. 3, p. 164–170, 2009.

WUBSHETA, S. G.; NYBERGA, N. T.; TEJESVIB, M. V.; PIRTTILÄB, A. M.; KAJULAC, M.; MATTILAC, S.; STAERKA, D. Targeting high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance analysis with high-resolution radical scavenging profiles—Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicillium namyslowskii*. **Journal of Chromatography**. v. 1302, p. 34–39, 2013.

XING X, GUO S, FU J. Biodiversity and distribution of endophytic fungi associated with *Panax quinquefolium* L. cultivated in a forest reserve. **Symbiosis** n. 51, p. 161–166, 2010.

YANG, Y. P.; LI, M.; HUI, C. M.; QIN, X. J.; FENG, H.; QUN, D. C.; HE, M. M.; HUANG, F. D.; QING, D. Y.; XIANG, Y. F. Phosphate solubilizing ability and phylogenetic diversity of bacteria from P-rich soils around Dianchi lake drainage area of China. **Pedosphere**, n. 5, v. 22, p. 707-716, 2012

YANG, K.; LIANG, J.; LI, Q.; KONG, X.; CHEN, R. JIN, Y. *Cladosporium cladosporioides* XJ-AC03, an aconitine-producing endophytic fungus isolated from *Aconitum leucostomum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. n. 5, v. 29, p. 933-938, 2013.

YOU, Y.-H. et al. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in suncheon bay. **Journal of microbiology and biotechnology**, n. 11, v. 22, p. 1549-1556, 2012.

ZHAN, F.; HE, Y.; ZU, Y. Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. n. 10, v. 27, p. 2483–2489, 2011.

ZHANG, Y.; LI, T.; LI, L.; ZHAO, Z. The colonization of plants by dark septate endophytes (DSE) in the valley-type savanna of Yunnan, southwest China. **African Journal of Microbiology Research**. n. 5, v. 31, p. 5540-5547, 2011.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, n. 1, v. 101, p. 292-297, 2010.