

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Endófitos Fúngicos Radiculares Associados à Cana-
de-Açúcar no Estado de São Paulo, Brasil**

Rosalba Ortega Fors

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**ENDÓFITOS FÚNGICOS RADICULARES ASSOCIADOS À CANA-DE-
AÇÚCAR NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

ROSALBA ORTEGA FORS

Sob orientação do Professor
Ricardo Luis Louro Berbara

e Co-orientação do Pesquisador
Orivaldo José Saggin Júnior

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Biologia do Solo

Seropédica – RJ
Fevereiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

F732e

Fors, Rosalba Ortega, 1989-
Endófitos fúngicos radiculares associados à cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil / Rosalba Ortega Fors. - Seropédica, 2020. 144 f.: il.

Orientador: Ricardo Luis Louro Berbara.
Coorientador: Orivaldo José Saggin Júnior.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo, 2020.

1. Endófitos septados escuros. 2. Glomeromycota. 3. Saccharum sp. . 4. Diversidade. 5. Inoculação. I. Berbara, Ricardo Luis Louro, 1957-, orient. II. Saggin Júnior, Orivaldo José, -, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

ROSALBA ORTEGA FORS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Biologia do Solo.

TESE APROVADA EM 12/02/2020

Orivaldo José Saggin Júnior. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Co-orientador)

Camila Maistro Patreze. Dra. UNIRIO

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

Jerri Édson Zilli. Dr. Embrapa Agrobiologia

Marco Aurélio Carneiro Carbone. Dr. UFLA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais
Ines Fors Fernández
e Ibrahin Ortega Oquendo

Ao meu esposo
Wilk Sampaio de Almeida

A minha avó Josefina Fernández
(in memoriam)

À vida...

*“Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me ha dado la risa y me ha dado el llanto
Así yo distingo dicha de quebranto
Los dos materiales que forman mi canto
Y el canto de ustedes que es el mismo canto
Y el canto de todos que es mi propio canto.”*

(Gracias a la vida, Mercedes Sosa)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

São muitas as pessoas, que de forma direta ou indireta têm me ajudado a chegar a ser o que hoje sou como ser humano e profissional. A todas elas meu agradecimento por terem me ajudado na caminhada até aqui. Não podem faltar duas pessoas, com espaço especial, eterno e intrasferível no meu coração: meus pais. A eles devo tudo o que sou e inclusive o que serei. Meu espelho, meu farol, tão longe na distância, mas tão perto e sempre presentes a cada passo.

Ao meu esposo, agradeço a paciência, a companhia, a compreensão, a amizade e o amor, o principal combustível na minha vida.

Agradeço aos meus orientadores, o Pesquisador Dr. Orivaldo José Saggin Júnior, meu pai científico na pós-graduação, pela dedicação, o tempo, a compreensão e os ensinamentos; e o Professor Dr. Ricardo Luis Louro Berbara pela oportunidade de estudar no Brasil e a orientação.

Ao técnico do Laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia, Itamar I. García pela ajuda no trabalho, as risadas e a amizade.

À analista Fernanda Dourado (Embrapa Agrobiologia) pela paciência e ajuda incessável no sequenciamento dos fungos isolados neste trabalho.

Às Professoras Dra. Camila Patreze e Dra. Irene Coelho, pela imensa paciência para explicar e compartilhar conhecimentos de biologia molecular.

À Dra. Cristiane Figueira pela ajuda nas análises de extração e quantificação de glomalina.

À pesquisadora Dra. Marcia Soares Vidal (Embrapa Agrobiologia) pelas mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.

À Dra. Vera L. Baldani e ao Dr. José Ivo Baldani (Embrapa Agrobiologia) por cederem as sementes de arroz.

Aos funcionários responsáveis pelas casas de vegetação da Embrapa Agrobiologia, em especial a Roberto Carlos da Silva, sempre prestes a ajudar.

Aos meus amigos. Agradecimento especial para Cândido Barreto, pela sinceridade, as conversas, os conselhos e a ajuda no trabalho. À Karine e à Kerly pelas horas mais doces de Seropédica.

Aos colegas da Embrapa Agrobiologia, em especial aqueles do Laboratório de Micorrizas, com os quais convivi desde o ano 2014. Em especial agradeço aos bolsistas de graduação Gustavo Cândido e Gabriel Rocha, pela ajuda no trabalho.

Agradeço às instituições de ensino, pesquisa e agências de fomento que tornaram possível esta pesquisa: Programa de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo (PPGACS), UFRRJ; Embrapa Agrobiologia; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) pela concessão da bolsa de estudos de doutorado (2016-2020).

A TODOS, MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradecemos especialmente a disponibilidade e colaboração nas amostragens em canaviais do Estado de São Paulo, das Empresas ligadas ao setor produtivo da cana-de-açúcar, juntamente com todos os seus cooperados, associados e funcionários. Em nome dos principais contatos estabelecidos agradecemos:

Às empresas:

- Raízen
- Zilor Energia e Alimentos
- Ferrari Agroindústria S.A.
- São Martinho
- Associação dos Plantadores de Cana do Oeste do Estado de São Paulo (Canaoeste)
- Atvos

Às pessoas que foram “pontos de contato” para organização da amostragem:

- Filipe José Almeida Arruda (Raízen)
- Tedson Luis de Freitas Azevedo (Zilor)
- Fábio Ferrari (Ferrari Agroindústria S.A.)
- Renê de Assis Sordi (São Martinho)
- Gilberto José Bianchi Lopes (Autônomo)
- Jorge Luiz Favaro Júnior (Atvos)

Às pessoas sem as quais a amostragem não seria possível:

- Rafael Caleffi e Sebastião dos Santos Ribeiro (Raízen – Matriz)
- Roberto Aparecido Gonçalves e Gabriela Zucari de Andrade (Zilor – Lençóis Paulista)
- Josiander da Costa Silva, Saulo Emanuel da Costa Pelegrino e Marcel Tomas de Arantes (Zilor – Quatá)
- Fernando Zola (Raízen – Costa Pinto)
- Cristiano Tavares (Ferrari Agroindústria)
- André Luis Pires (São Martinho – Santa Cruz)
- Luis Renato de Paula Ferreira (São Martinho – São Martinho)
- Caio Spada de Toledo Piza (Raízen – Junqueira)
- Ivan Tilelli Burjaili (Canaoeste)
- Emerson Santos e Alessandro Martins (Raízen – Univalen)
- Jorge Luiz Favaro Júnior (Atvos – Conquista do Pontal)
- Lucas Carneiro Volpato e Juliana Carla Fernandes (Raízen – Ipaussu)
- e outras inúmeras que colaboraram, sem que fixássemos seus nomes.

RESUMO GERAL

FORS, Rosalba Ortega. **Endófitos fúngicos radiculares associados à cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil**. 2020. 144f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

O impacto ambiental derivado do uso excessivo de insumos químicos na agricultura convencional alerta para a necessidade de alternativas sustentáveis, com destaque para o aproveitamento biotecnológico da interação planta-microrganismo. Compreender a estrutura comunitária da microbiota endofítica, assim como os fatores moduladores da sua composição em agroecossistemas representa o passo inicial para a seleção e desenvolvimento de inoculantes. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a composição de espécies das comunidades de fungos endofíticos septados escuros (*Dark Septate Endophytes* – DSE), fungos endofíticos radiculares no geral (FER) e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) associados à cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil, verificando possíveis relações entre a ocorrência das espécies e as características químicas do solo. Adicionalmente, o trabalho visou explorar o potencial de alguns isolados de DSE na promoção de crescimento vegetal. A simbiose com DSE foi observada nas variedades de cana RB867515, RB966928 e RB92579 e em uma variedade ainda não comercializada de cana-energia. A partir destas variedades, 16 fungos DSE foram isolados e identificados morfológica e molecularmente como pertencentes às ordens Helotiales, Pleosporales e Xylariales. Alguns destes fungos, com ênfase nos isolados de *Periconia macrospinoso* (Pleosporales), estimularam a absorção de P em plantas de cana e arroz, e solubilizaram óxido de zinco *in vitro*. A comunidade de FER associada à variedade de cana RB966928 em 24 plantações de São Paulo distribuídas na maioria das mesorregiões produtoras de cana-de-açúcar no estado foi dominada por espécies dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma*, assim como pela espécie de DSE *P. macrospinoso*. Já a comunidade de FMAs associada a esta variedade foi dominada pelas espécies *Acaulospora mellea*, *A. scrobiculata*, *Glomus macrocarpum*, *G. microaggregatum*, *Racocetra persica* e *Sieverdingia tortuosa*. Conclui-se que as simbioses com DSE e FMAs ocorrem e coexistem naturalmente nas raízes da cana-de-açúcar, independentemente da variedade. A análise de redundância (RDA) mostrou que a ocorrência de espécies de FMAs foi modulada pelas características químicas do solo, não sendo este o padrão verificado para a comunidade de FER.

Palavras chave: Fungos associados a raízes. Endófitos septados escuros. Glomeromycota. *Saccharum* sp. Diversidade. Inoculação.

GENERAL ABSTRACT

FORS, Rosalba Ortega. **Root fungal endophytes associated to sugarcane in the state of São Paulo, Brazil.** 2020. 144p. Thesis (Doctorate in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Environmental problems derived from the excessive use of chemical inputs in conventional agriculture alerts towards the application of sustainable alternatives, with emphasis on the biotechnological use of the plant – microorganism interaction. Understanding the community structure of the endophytic microbiota, as well as the factors that modulate its composition in agroecosystems represent the initial step for the selection and development of inoculants. The present work aimed to evaluate the diversity of dark septate endophytes (DSE), general root endophytic fungi (REF) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated to sugarcane in the Brazilian state of São Paulo; searching for possible relationships between the occurrence of the fungal species and the soil chemical properties. Also, the potential of some DSE fungi in promoting plant growth was explored. Symbiosis with DSE was observed in the sugarcane varieties RB867515, RB966928 and RB92579 and in one not commercialized energy-cane variety. From the latter, 16 DSE fungi were isolated and identified within the orders Helotiales, Pleosporales and Xylariales. Some of these fungi, especially isolates of *Periconia macrospinoso* (Pleosporales), stimulated P uptake in sugarcane and rice plants, and solubilized zinc oxide *in vitro*. The REF community of the sugarcane variety RB966928, considering plants sampled in 24 fields of São Paulo, distributed among most of the mesoregions of the State, was dominated by species of the genera *Fusarium* and *Trichoderma*, as well as by the DSE *P. macrospinoso*. The AMF community associated with this sugarcane variety was dominated by the species *Acaulospora mellea*, *A. scrobiculata*, *Glomus macrocarpum*, *G. microaggregatum*, *Racocetra persica* e *Sieverdingia tortuosa*. It was concluded that symbioses with DSE and AMF occur and coexist naturally in the roots of sugarcane, regardless of the variety. As verified by the redundancy analysis (RDA), the occurrence of AMF species was modulated by the chemical characteristics of the soil, which was not the pattern verified for the REF community.

Key words: Root associated fungi. Dark septate endophytes. Glomeromycota. *Saccharum* sp. Diversity. Inoculation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Raízes de cana-de-açúcar colonizadas por endófitos septados escuros. Plantas cultivadas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil e amostradas em julho de 2016. (A) Microescleródio melanizado; (B) Microescleródio hialino após tincão com azul de metila; (C), (D) Microescleródios em formação. 12
- Figura 2.** Colônias (a esquerda: vista superior; a direita: vista inferior) de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar cultivadas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Os códigos A111-A126 referem-se à identificação atribuída aos fungos no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner, onde os isolados foram depositados..... 14
- Figura 3.** Micromorfologia em meio extrato de malte-ágar dos isolados A111, A113, A115, A124, A125 e A126 de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar amostradas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Imagens com ampliação de 100X (1ª coluna), 400X (2ª coluna) e 1000X (3ª coluna)..... 16
- Figura 4.** Micromorfologia em meio extrato de malte-ágar dos isolados A112, A119, A122, A120, A121 e A123 de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar amostradas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Imagens com ampliação de 100X (1ª coluna), 400X (2ª coluna) e 1000X (3ª coluna)..... 17
- Figura 5.** Micromorfologia em meio extrato de malte-ágar dos isolados A118, A114, A116 e A117 de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar amostradas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Imagens com ampliação de 100X (1ª coluna), 400X (2ª coluna) e 1000X (3ª coluna). 18
- Figura 6.** Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de fungos endofíticos septados escuros isolados de cana-de-açúcar (em negrito) e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000..... 20
- Figura 7.** Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região LSU de fungos endofíticos septados escuros isolados de cana-de-açúcar (em negrito) e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000..... 21
- Figura 8.** Análise de Máxima Verossimilhança com sequências concatenadas das regiões codificadoras dos genes referentes a ACT, TEF e TUB de fungos endofíticos septados escuros isolados de cana-de-açúcar. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000..... 23
- Figura 9.** Valores médios (\pm erro padrão) do peso fresco da parte aérea de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação com 15 isolados de endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado..... 36
- Figura 10.** Valores médios (\pm erro padrão) do peso seco da parte aérea de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação com 15 isolados de endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado..... 37
- Figura 11.** Resposta à inoculação em relação ao controle não inoculado de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) inoculadas com 15 isolados de endófitos septados escuros (A11-A126) em função do peso seco da parte aérea das

plantas. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).	38
Figura 12. Valores médios (\pm erro padrão) do volume radicular de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação com 15 isolados de endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado.....	39
Figura 13. Colonização radicular de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar IAC5000 60 dias após inoculação <i>in vitro</i> com os endófitos septados escuros <i>Curvularia</i> sp. (A-C), <i>Nigrospora</i> sp. (D-F) e <i>Periconia macrospinoso</i> (G-I) previamente isolados da própria cultura.	40
Figura 14. Teor de fósforo foliar de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação <i>in vitro</i> com endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado.	41
Figura 15. Quantidade de fósforo foliar de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação com endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado.	42
Figura 16. Plantas de arroz aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) com os isolados A111, A113 e A124 de <i>Periconia macrospinoso</i> e o fungo micorrízico arbuscular <i>Rhizophagus clarus</i> A5. A111+A5: inoculação de <i>P. macrospinoso</i> A111 e <i>R. clarus</i> A5, com adubação reduzida; A113+A5: inoculação de <i>P. macrospinoso</i> A113 e <i>R. clarus</i> A5, com adubação reduzida; A124+A5: inoculação de <i>P. macrospinoso</i> A124 e <i>R. clarus</i> A5, com adubação reduzida; A5: controle não inoculado com <i>P. macrospinoso</i> e inoculado com <i>R. clarus</i> A5, com adubação reduzida; Ni: controle não inoculado com ambos, <i>P. macrospinoso</i> e <i>R. clarus</i> A5, com adubação reduzida; A5+adub: controle não inoculado com <i>P. macrospinoso</i> e inoculado com <i>R. clarus</i> A5, com adubação completa.....	44
Figura 17. Microescleródios (A,B, D-I) e hifas do tipo “runner” (C) em plantas de arroz da variedade Arroz 70 aos 60 dias após inoculação com os isolados A111 (A-F) e A124 (G-I) do fungo endofítico septado escuro <i>Periconia macrospinoso</i>	48
Figura 18. Valores médios (\pm erro padrão) da eficiência relativa de solubilização de óxido de zinco em meio de cultura sólido pelas colônias de diferentes isolados de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar da região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo test de Scott Knott ($p \leq 0,05$)......	49
Figura 19. Localização dos pontos de amostragem (1-24) de touceiras de cana-de-açúcar da variedade RB966928 no Estado de São Paulo entre 26/05/2017 e 09/06/2017 para isolamento de endófitos fúngicos radiculares.....	62
Figura 20. Curva de acumulação de espécies da comunidade de fungos endofíticos radiculares de cana-de-açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo e amostrada entre maio e junho de 2017. Curva estimada a partir de 1000 permutações aleatorizadas.	67
Figura 21. Percentagem de isolados e espécies por ordem do filo Ascomycota de endófitos fúngicos radiculares isolados de cana-de-açúcar (RB966928) cultivada no estado de São Paulo, Brasil.....	73
Figura 22. Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de isolados de endófitos radiculares isolados de cana-de-açúcar RB966928 agrupados dentro do gênero <i>Fusarium</i> e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam	

	a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um <i>bootstrap</i> de 1000.....	75
Figura 23.	Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de isolados representativos de cada espécie dentro do gênero <i>Trichoderma</i> e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um <i>bootstrap</i> de 1000.....	76
Figura 24.	Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de isolados de endófitos radiculares isolados de cana-de-açúcar RB966928 agrupados em Ascomycota (exceto gêneros <i>Trichoderma</i> e <i>Fusarium</i>) e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um <i>bootstrap</i> de 1000.	77
Figura 25.	Porcentagem de ordens do filo Basidiomycota em relação ao total de isolados e espécies de fungos endófitos radiculares isolados de cana-de-açúcar RB966928 cultivada no estado de São Paulo, Brasil.	79
Figura 26.	Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de isolados de endófitos radiculares isolados de cana-de-açúcar RB966928 agrupados em Basidiomycota e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um <i>bootstrap</i> de 1000.	80
Figura 27.	Curva de acumulação de espécies de fungos micorrízicos arbusculares associados à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo e amostrada entre maio e junho de 2017. Boxplots representam a variação estimada a partir de 1000 permutações aleatorizadas do número de espécies em função do esforço amostral, considerando um intervalo de confiança de 95% (sombra cinza).	94
Figura 28.	Esporos de algumas espécies de fungos micorrízicos arbusculares verificadas em plantações de cana-de-açúcar variedade RB966928 do estado de São Paulo e sua respectiva classificação quanto ao nível de dominância na comunidade. Dominantes: A <i>Acaulospora scrobiculata</i> , B <i>A. mellea</i> , C-D <i>Racocetra persica</i> , E <i>Glomus microaggregatum</i> ocupando esporo de <i>R. persica</i> , D <i>Sieverdingia tortuosa</i> ; Muito comuns: G <i>G. clavisporum</i> , H <i>Ambispora leptoticha</i> colonizado por <i>G. microaggregatum</i> ; Comuns: I <i>Claroideogломus etunicatum</i> , J <i>Kuklospora colombiana</i> , K <i>Dentiscutata scutata</i> , L <i>Claroideogломus lamellosum</i> ; Raras: M <i>D. cerradensis</i> ; N <i>A tuberculata</i> , O-P <i>Entrophospora infrequens</i>	97
Figura 29.	Colonização radicular por fungos endofíticos septados escuros (A-C) e por fungos micorrízicos arbusculares (D-F) em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 cultivada no estado de São Paulo, Brasil amostrada entre maio e junho de 2017.....	101
Figura 30.	Colonização por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e endófitos septados escuros (DSE) em raízes de plantas de cana-de-açúcar variedade RB966928 coletadas em 24 pontos de amostragem no estado de São Paulo, Brasil entre maio e junho de 2017.	102
Figura 31.	Matriz de correlação de Pearson. Na diagonal a distribuição de cada variável, embaixo da diagonal os gráficos de dispersão bivariada e acima os valores do coeficiente de correlação com a respectiva indicação de significância (“****” $p \leq 0,001$; “***” $p \leq 0,01$, “**” $p \leq 0,05$, “ns” não significativo). DENS: densidade de esporos de FMAs; RSP: riqueza de espécies de FMAs; FMA: colonização por FMAs; DSE: colonização por DSE; EEGRSP: fração facilmente extraível de proteína do solo relacionada à glomalina; TGRSP: fração total de proteína do solo relacionada à glomalina. C, N, Ca, H+Al, Mg, P, K representam os teores destes elementos nas análises de fertilidade dos solos; pH: potencial hidrogeniônico do solo.....	103

Figura 32. Análise de redundância (RDA) com base na presença/ausência das espécies de FMAs e características de fertilidade do solo (pH, P, K, Ca, Mg, Al, H+Al) nos 24 pontos de amostragem de cana-de-açúcar da variedade RB966928 no estado de São Paulo, Brasil, coletados entre maio e junho de 2017. Percentagem de explicação dos eixos RDA1:11,96% e RDA2: 10,32%; $p < 0,001$ 104

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Municípios e características químicas dos solos referentes aos 16 pontos amostrados em 12 e 13 de julho de 2016 para isolamento de endófitos septados escuros na região produtora cana-de-açúcar de Quatá, São Paulo, Brasil..... 9
- Tabela 2.** Variedades e idade da cana-de-açúcar, georeferência e número de isolados obtidos dos pontos amostrados em 12 e 13 de julho de 2016 para isolamento de endófitos septados escuros na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. 13
- Tabela 3.** Identificação molecular de endófitos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar amostradas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil em julho de 2016..... 22
- Tabela 4.** Altura da planta até a folha +1 (mm), largura e comprimento da folha +1 (mm), número de folhas e perfilhos de plantas de arroz das variedades BRS Esmeralda e Arroz 70 após 30 e 55 dias da inoculação com as linhagens A111, A113 e A124 do fungo endofítico septado escuro (DSE) *Periconia macrospinoso* e do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5. 45
- Tabela 5.** Peso fresco e seco da parte aérea (g), volume radicular (cm³) e peso seco das raízes (g) de plantas de arroz das variedades BRS Esmeralda e Arroz 70 após 60 dias da inoculação com as linhagens A111, A113 e A124 do fungo endofítico septado escuro *Periconia macrospinoso* e do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5. 46
- Tabela 6.** Teores folhares de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, e em plantas de arroz das variedades BRS Esmeralda e Arroz 70 após 60 dias da inoculação com as linhagens A111, A113 e A124 do fungo endofítico septado escuro (DSE) *Periconia macrospinoso* e do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5. 46
- Tabela 7.** Colonização radicular de plantas de arroz das variedades BRS Esmeralda e Arroz 70 após 60 dias da inoculação com as linhagens A111, A113 e A124 do fungo endofítico septado escuro (DSE) *Periconia macrospinoso* e do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5 (FMA)..... 47
- Tabela 8.** Pontos de amostragem (1-24) de touceiras de cana-de-açúcar da variedade RB966928 no Estado de São Paulo para isolamento de fungos endofíticos das raízes. 63
- Tabela 9.** Características químicas dos solos rizosféricos amostrados em cada ponto de amostragem das touceiras de cana-de-açúcar da variedade RB966928 (1^a soqueira) coletadas no estado de São Paulo, durante os meses de maio e junho de 2017 para isolamento de fungos endofíticos radiculares. 64
- Tabela 10.** Parâmetros contabilizados da comunidade de fungos endofíticos isolados de raízes de cana-de-açúcar açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo em 24 amostras coletadas entre maio e junho de 2017..... 68
- Tabela 11.** Espécies de fungos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar RB966928 identificadas por análise filogenética da região ITS por verossimilhança com sequências disponíveis na base de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI)..... 69
- Tabela 12.** Frequência relativa (FR), frequência de ocorrência (FO) e nível de dominância de espécies de fungos endofíticos isolados de raízes de cana-de-açúcar açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo, Brasil..... 71
- Tabela 13.** Lista de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (Filo Glomeromycota) associados à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo, Brasil..... 95
- Tabela 14.** Ocorrência no campo e/ou na cultura armadilha (+), frequência de ocorrência (FO%) e nível de dominância (Nível) de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) identificadas nos 24 pontos de amostragem de touceiras de cana-de-açúcar

variedade RB966928 coletadas entre 26/05/2017 e 09/06/2017 em lavouras no estado de São Paulo, Brasil.....	98
Tabela 15. Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e quantidade de proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (EE-GRSP) e total (T-GRSP) em amostras de solos rizosférico de plantas de cana-de-açúcar Variedade RB966928 amostradas entre maio e junho de 2017 em diferentes plantações do estado de São Paulo, Brasil.....	100

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Listagem dos 391 isolados de fungos endofíticos isolados de raízes de cana-de-açúcar variedade RB966928 em 24 pontos de amostragem tomados entre maio e junho de 2017 no estado de São Paulo, Brasil.....	134
---	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	CAPÍTULO I	3
	FUNGOS ENDOFÍTICOS SEPTADOS ESCUROS ASSOCIADOS ÀS RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR na região produtora de QUATÁ, SÃO PAULO, BRASIL	3
2.1	RESUMO	4
2.2	ABSTRACT	5
2.3	INTRODUÇÃO	6
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	8
2.4.1	Amostragem de campo e isolamento de fungos endofíticos septados escuros	8
2.4.2	Identificação dos isolados de fungos endofíticos septados escuros	10
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
2.5.1	Isolados de fungos endofíticos septados escuros	12
2.5.2	Identificação dos isolados de fungos endofíticos septados escuros	18
2.6	CONCLUSÕES	26
3.	CAPÍTULO II	27
	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E DA SOLUBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES POR ENDÓFITOS SEPTADOS ESCUROS ISOLADOS DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR	27
3.1	RESUMO	28
3.2	ABSTRACT	29
3.3	INTRODUÇÃO	30
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.4.1	Inoculação <i>in vitro</i> de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar com isolados de endófitos septados escuros	32
3.4.2	Inoculação de duas variedades de arroz com três isolados de <i>Periconia macrospinosa</i> e um isolado de <i>Rhizophagus clarus</i>	32
3.4.3	Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco <i>in vitro</i> por isolados de endófitos septados escuros	34
3.4.4	Análise dos Dados	35
3.5	RESULTADOS	36
3.5.1	Inoculação <i>in vitro</i> de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar com isolados de endófitos septados escuros	36
3.5.2	Inoculação de duas variedades de arroz com três isolados de <i>Periconia macrospinosa</i> e um isolado de <i>Rhizophagus clarus</i>	42
3.5.3	Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco <i>in vitro</i> por isolados de endófitos septados escuros	49
3.6	DISCUSSÃO	50
3.6.1	Inoculação <i>in vitro</i> de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar com isolados de endófitos septados escuros	50
3.6.2	Inoculação de duas variedades de arroz com três isolados de <i>Periconia macrospinosa</i> e um isolado de <i>Rhizophagus clarus</i>	52

3.6.3	Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco <i>in vitro</i> por isolados de endófitos septados escuros	55
3.7	CONCLUSÕES	56
4	CAPÍTULO III	57
COMUNIDADES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS RADICULARES ASSOCIADOS À VARIEDADE RB966928 DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.....		
		57
4.1	RESUMO.....	58
4.2	ABSTRACT.....	59
4.3	INTRODUÇÃO	60
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.4.1	Amostragem	62
4.4.2	Isolamento de endófitos fúngicos radiculares	64
4.4.3	Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	65
4.4.4	Análise dos dados.....	66
4.5	RESULTADOS.....	67
4.5.1	Isolamento de endófitos fúngicos radiculares	67
4.5.2	Filo Ascomycota	72
4.5.3	Filo Basidiomycota	79
4.6	DISCUSSÃO	82
4.7	CONCLUSÕES	88
5	CAPÍTULO IV	89
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASSOCIADOS À RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR VARIEDADE RB966928 NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.....		
		89
5.1	RESUMO.....	90
5.2	ABSTRACT.....	91
5.3	INTRODUÇÃO	92
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	93
5.5	RESULTADOS.....	94
5.6	DISCUSSÃO	106
5.7	CONCLUSÕES	112
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
7	CONCLUSÕES GERAIS.....	133
8	ANEXOS	134

1 INTRODUÇÃO GERAL

Simbioses entre plantas e microrganismos são antigas, com registros fósseis remontando ao período da conquista do ambiente terrestre pelos vegetais, a qual, de acordo com hipóteses, foi possibilitada pela associação com fungos micorrízicos. Nos últimos anos, as complexas comunidades microbianas que interagem com as plantas, seja superficialmente na filosfera ou na rizosfera, ou endofiticamente (no interior dos tecidos), têm sido tema de interesse em pesquisas por sua importância na saúde e desenvolvimento das plantas, entre outras possibilidades biotecnológicas. O conceito de holobionte vegetal surge para definir a planta com seus microrganismos simbioses associados formando um metaorganismo, cujo desempenho no ecossistema depende da sua interação com as condições ambientais.

Assim, diversos fatores referentes à genética e ao ambiente influenciam o balanço e composição das comunidades microbianas que interagem com as plantas. A expansão da fronteira agrícola associada às práticas de agricultura convencional, como revolvimento de solo, uso de agrotóxicos e implementação de culturas mono específicas afetam a microbiota associada aos vegetais. Estes sistemas agrícolas se alicerçam em recursos não renováveis, como por exemplo, as fontes minerais de fertilizantes fosfatados e potássicos, e a síntese de compostos baseados na indústria do petróleo. Porém, os usos excessivos de insumos químicos nos sistemas agrícolas geram problemas de poluição ambiental, como por exemplo aumentos dos níveis de metais pesados no solo e eutrofização de corpos de água. Desta forma, destaca-se a importância de pesquisas que abordem a microbiota associada às plantas em sistemas agrícolas para uma melhor compreensão das alterações nas comunidades, assim como os fatores determinantes dessas mudanças. Ao mesmo tempo, o isolamento de microrganismos adaptados a estes ambientes e a sua posterior seleção como promotores do crescimento vegetal pode diminuir a necessidade por insumos químicos nos ecossistemas agrícolas, os tornando mais sustentáveis.

A cana-de-açúcar é a terceira monocultura com maior área plantada no Brasil, sendo o país o maior produtor da cultura no mundo. A demanda crescente por etanol derivado da cana-de-açúcar, regerá a necessidade de expansão da cultura pelo território brasileiro. Assim, os efeitos negativos no solo e no ambiente atualmente associados à produção canavieira convencional serão proporcionalmente incrementados, a menos que tecnologias com foco mais conservacionista sejam adotadas.

Nesse contexto o presente estudo se baseou nas seguintes hipóteses:

- (i) A simbiose da cana-de-açúcar com fungos endófitos septados escuros (*Dark Septate Endophytes* - DSE) ocorre naturalmente independentemente da variedade;
- (ii) Fungos endofíticos septados escuros (DSE) isolados de cana-de-açúcar podem ser selecionados como promotores do crescimento vegetal, e
- (iii) As características químicas do ambiente edáfico determinam comunidades diferentes de endófitos fúngicos radiculares e fungos micorrízicos arbusculares em lavouras de cana-de-açúcar de uma mesma variedade.

Para elucidar essas hipóteses, no Capítulo I avaliou-se a diversidade de fungos DSE em raízes de cana-de-açúcar das variedades RB867515, RB966928 e RB92579, e quatro variedades de cana-energia não comercializadas. No Capítulo II foi estudada a capacidade promotora de crescimento vegetal de isolados DSE em plantas de cana-de-açúcar e duas variedades de arroz, assim como a capacidade solubilizadora de fósforo e zinco destes fungos. Nos Capítulos III e IV foram realizados levantamentos da comunidade de endófitos fúngicos radiculares e fungos

micorrízicos arbusculares, respectivamente, associados à variedade de cana-de-açúcar RB966928 cultivada no estado de São Paulo.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a composição de espécies das comunidades de fungos endofíticos septados escuros (*Dark Septate Endophytes* – DSE), fungos endofíticos radiculares no geral (FER) e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) associados à cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil, isolando linhagens e verificando possíveis relações entre a ocorrência das espécies e as características químicas do solo. Adicionalmente, o trabalho visou explorar o potencial de alguns isolados de DSE na promoção de crescimento vegetal.

2 CAPÍTULO I

FUNGOS ENDOFÍTICOS SEPTADOS ESCUROS ASSOCIADOS ÀS RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR NA REGIÃO PRODUTORA DE QUATÁ, SÃO PAULO, BRASIL

2.1 RESUMO

Os fungos endofíticos septados escuros (DSE) constituem um grupo polifilético dentro do filo Ascomycota. Apresentam distribuição mundial e associam-se às raízes de diversas espécies vegetais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de DSE em raízes de cana-de-açúcar das variedades RB867515, RB966928 e RB92579, e quatro variedades de cana-energia não comercializadas. De um total de 63 fungos endofíticos radiculares isolados, 16 foram pré-selecionados como DSE, considerando-se a cor das colônias em meio extrato de malte ágar. O maior número de DSE foi obtido das variedades RB966928 e RB867515, com seis e cinco isolados cada. Das quatro variedades de cana-energia, somente uma apresentou fungos com aparência de DSE. A partir da análise das sequências de DNA da região espaçadora interna transcrita (ITS) e a subunidade maior (LSU), associada à micromorfologia dos isolados, foi possível a diferenciação de 16 isolados em seis grupos de ascomicetos, distribuídos em três classes e pelo menos cinco famílias e quatro gêneros. A ordem Pleosporales representou 80% dos isolados, e a espécie com maior frequência de isolamento foi *Periconia macrospinoso* com seis isolados, e ocorrência nas variedades RB867515 e cana-energia 3. Estes resultados confirmam que a simbiose com DSE ocorre naturalmente em variedades de cana-de-açúcar e corroboram o caráter generalista destes fungos, pois algumas das espécies detectadas já foram reportadas associadas a outros hospedeiros vegetais e em diversos ecossistemas e regiões do mundo.

Palavras-chave: Fungos Associados a Raízes. DSE. *Saccharum* sp. Simbiontes. Ascomycota.

2.2 ABSTRACT

Dark septate endophytes (DSE) constitute a polyphyletic group within the Ascomycota. They have a global distribution and associate with the roots of several plant species. The present study aimed to evaluate the diversity of DSE in sugarcane roots of the varieties RB867515, RB966928 and RB92579, and four varieties of not commercialized energy cane. From a total of 63 fungal root endophytes isolated, 16 were pre-selected as DSE when considered the color of the colonies grown in malt extract agar medium. The highest number of DSE corresponded to the varieties RB966928 and RB867515, with six and five isolates each. Just one of the four energy cane varieties had fungi with DSE appearance. The analyses of the DNA sequences from the internal transcribed spacer (ITS) and the large sub-unit (LSU), in association with the micromorphology of the isolates, allowed the differentiation of the 16 isolates in six groups of ascomycetes, distributed in three classes, and at least five families and four genera. The order Pleosporales represented 80% of the isolates, and the species *Periconia macrospinosa*, with six isolates, accounted for the highest isolation frequency, being present in the varieties RB867515 and Energy cane 3. The results confirm that the DSE symbiosis occurs naturally in sugarcane varieties, and corroborate the generalist character of these fungi, since some of the detected species have already been reported associated to other plant hosts and diverse ecosystems and regions of the world.

Key words: Root-associated fungi. DSE. *Saccharum* sp. Symbionts. Ascomycota.

2.3 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos septados escuros, mais conhecidos pela abreviatura em inglês DSE (*dark septate endophytes*), representam um grupo polifilético, integrado por gêneros e grupos de espécies com diversidade críptica dentro do filo Ascomycota (Grünig et al., 2011; Ruotsalainen, 2018). Na sua associação com as raízes de plantas, os DSE colonizam o córtex pela formação inter ou intracelular de estruturas melanizadas, incluindo hifas septadas e microescleródios (Rodriguez et al., 2009). Embora os estudos envolvendo esta simbiose remontam ao início do século XX (Jumpponen & Trappe, 1998), o interesse e consequente aumento do número de pesquisas e publicações ao seu respeito concentram-se nas últimas três décadas (Berthelot et al., 2019). Apesar dos recentes avanços, são requeridos ainda novos estudos que permitam concluir sobre a diversidade taxonômica e funcional deste grupo (Mandyam & Jumpponen, 2015; Ruotsalainen, 2018). Em torno de 30 espécies de DSE já foram descritas (Knapp et al., 2015) distribuídas principalmente entre as ordens Pleosporales e Helotiales, e com menor representatividade de gêneros em outras ordens como Capnodiales, Eurotiales, Sordariales e Xylariales, entre outras (Grünig et al., 2011; Berthelot et al., 2019).

Diversos trabalhos indicam uma ampla distribuição e ocorrência dos DSE em diferentes ecossistemas (Jumpponen & Trappe, 1998) e sua interação com grande número de espécies vegetais (Mandyam et al., 2010; Knapp et al., 2012; Mandyam et al., 2012; Bonfim et al., 2016; Hou et al., 2019). Aparentemente ocorre sobreposição do nicho ecológico ocupado pelos DSE e pelos fungos denominados micorrízicos. Inicialmente os DSE eram denominados “pseudomicorrizas” (ver revisão realizada por Jumpponen & Trappe, 1998). Porém, os DSE distinguem-se atualmente dos fungos micorrízicos pela ausência de estruturas intrarradiculares específicas para o intercâmbio de carbono e nutrientes como, por exemplo, arbúsculos, pelotões e Rede de Hartig, e por ser o funcionamento da sua simbiose altamente variável nos hospedeiros vegetais (Ruotsalainen, 2018).

Embora alguns resultados surgiram efeito benéfico da inoculação com fungos DSE (Vergara et al., 2017; He et al., 2019), existem também observações de resultados neutros e até negativos derivados da sua associação com as raízes (Mandyam et al., 2013; Rothen et al., 2017). Sugere-se que fatores associados ao estado fisiológico do hospedeiro vegetal, condições ambientais, fontes de nitrogênio e até certa preferência entre linhagens/espécies de DSE e genótipos ou grupos vegetais, podem explicar estas variações no contínuo mutualismo-parasitismo (Mandyam et al., 2013; Mayerhofer et al., 2013; Mandyam & Jumpponen, 2015).

São atualmente poucos os estudos que têm abordado a diversidade e função dos fungos DSE associados a espécies de interesse agrícola (Rothen et al., 2017; Santos et al., 2017; Vergara et al., 2017; Hulse, 2018). Em cana-de-açúcar, Souza et al. (2016) constataram elevada abundância relativa das ordens Polyporales, Eurotiales e outros fungos ascomicetos e basidiomicetos não identificados na comunidade endofítica radicular. Em outro trabalho, Romão-Dumaresq et al. (2016) reportaram uma comunidade de RAF (*root-associated fungi*) representada por pelo menos 35 gêneros com predominância do filo Ascomycota em áreas plantadas com duas variedades de cana-de-açúcar, sendo uma convencional e outra transgênica, em São Paulo, Brasil. Na Austrália, a avaliação da dinâmica da colonização por fungos micorrízicos arbusculares e DSE durante a ciclo da cana-de-açúcar (primeira e segunda soca), indicou diminuição na colonização por DSE entre a primeira e segunda soca (Claassens et al., 2018). Mais recentemente, Fors et al. (2020) reportaram abundante colonização por DSE e formação de estruturas típicas destes fungos como microescleródios e clamidósporos em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares.

Devido à importância da cultura da cana-de-açúcar no Brasil é necessário intensificar estudos que abordem de forma específica a ocorrência destes fungos nas lavouras canavieiras, ampliando o isolamento e identificação dos DSE da cana e consequente avaliação da

importância desta simbiose para a cultura. Considerando que o Brasil é o principal produtor mundial de cana-de-açúcar, e o estado de São Paulo o maior pólo canavieiro do país (Rudorff et al., 2010), o presente estudo se apresenta como pioneiro na abordagem de levantamento específico dos DSE colonizadores de *Saccharum* spp., criando bases para futuros estudos envolvendo a função e possível aplicação biotecnológica destes simbiontes na cultura da cana-de-açúcar. Assim, esse trabalho teve como objetivo isolar e identificar espécies de DSE associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas na região produtora de Quatá, São Paulo.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Amostragem de campo e isolamento de fungos endofíticos septados escuros

Um total de 16 plantas de cana-de-açúcar foram coletadas em canaviais da Usina Zilor Açucareira Quatá S/A situada no município de Quatá, estado de São Paulo, Brasil (-22,250137° -50,653517°). A região produtora de cana-de-açúcar de Quatá, que inclui os municípios ao redor, possui precipitação média anual de 1205 mm, sendo dezembro, janeiro e fevereiro os meses de maior pluviosidade, com 168, 186 e 185 mm/mês, respectivamente. A estação seca da região ocorre entre abril e setembro, com valores médios mensais de 31 a 69 mm, sendo os meses de menor precipitação julho e agosto, com valores de 31 e 32 mm/mês, respectivamente. A temperatura média da região é de 22,4 °C (Sentelhas et al., 2019). Os solos predominantes na região incluem Latossolo Vermelho de textura média e Argissolo Vermelho ou Vermelho-Amarelo de textura arenosa-média ou média-argilosa (Dados da usina). Os 16 pontos amostrados se distribuem em três municípios e nove solos diferentes, cujas características químicas são apresentadas na Tabela 1. Foram coletadas plantas adultas das variedades RB867515, RB92579 e RB966928, além de quatro variedades de cana-energia (CE) ainda não comercializadas, chamadas aqui como CE1, CE2, CE3 e CE4.

As amostras de solo e raízes foram conduzidas para o Laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia, onde as raízes das plantas foram lavadas com água corrente e cortadas em segmentos de aproximadamente 2-3 cm de comprimento. Em câmara de fluxo foi realizada a desinfecção superficial mediante a imersão sucessiva em hipoclorito de sódio (2,5%) por dois minutos, peróxido de hidrogênio (33%) por um minuto e água destilada estéril (cinco vezes consecutivas) (Ribeiro et al., 2011). Posteriormente, com ajuda de bisturi e pinça estéreis, as extremidades dos segmentos foram cortadas e descartadas. As partes conservadas, foram então subdivididas em pedaços de aproximadamente 3-5 mm, e distribuídos (1 pedaço/gota) em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo de 30 - 40 gotas de Gel-Gro[®] (3,5 g/L) contendo MgSO₄ (0,3 g/L), sulfato de gentamicina (0,25 mg/L) e sulfato de estreptomicina (0,25 mg/L), com pH ajustado para 6,0 (Silvani et al., 2008). Adicionalmente, cinco pedaços de raízes de cada amostra foram colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio Extrato de Malte-Ágar (MEA) (Extrato de malte 20 g/L; Dextrose 20 g/L; Peptona 1 g/L e Ágar 15 g/L) suplementado com os mesmos antibióticos/concentrações descritas acima, com pH ajustado para 5,5. Para cada amostra colocaram-se raízes em três placas com MEA, totalizando 15 pedaços/amostra neste meio de cultura. As placas, com ambos os meios de cultura utilizados foram incubadas a 27°C no escuro.

Colônias fúngicas, crescidas a partir das extremidades dos segmentos radiculares, foram isoladas para novas placas de Petri de igual tamanho contendo MEA, as quais foram mantidas em iguais condições de incubação. Colônias de fungos de cores claras foram descartadas, devido à falta de correspondência com as características típicas de hifas melanizadas dos DSE (Jumpponen & Trappe, 1998), restando assim apenas isolados de colônias nas cores marrom, cinza ou preta, conforme o critério de diferenciação proposto por Grünig et al. (2011). Foram montadas lâminas de microscopia utilizando o método do micro-cultivo para a observação em microscópio óptico das estruturas de cada isolado (Ali-Shtayeh et al., 1998).

Visando verificar a colonização do sistema radicular por DSE nas plantas amostradas, as raízes não utilizadas na fase de isolamento foram clarificadas e coradas conforme técnicas comumente utilizadas para a observação de fungos micorrízicos arbusculares ilustradas por Novais et al. (2017). Após o processamento, as raízes foram visualizadas em microscópio estereoscópico e segmentos colonizados foram montados em lâminas para microscopia, usando como solução de montagem polivinil-lacto-glicerol (PVLG), as quais foram observadas e fotografadas em microscópio óptico.

Tabela 1. Municípios e características químicas, georeferência, altitude, variedade de cana e idade da lavoura canavieira referentes aos 16 pontos amostrados em 12 e 13 de julho de 2016 para isolamento de endófitos septados escuros na região produtora cana-de-açúcar de Quatá, São Paulo, Brasil.

Município	pH	MO g/dm ³	P-resina mg/dm ³	K ----- mmol/dm ³ -----	Ca	Mg	H+Al	Al	CTC	Ponto amostral	Latitude Graus	Longitude decimais	Altitude m	Variedade de cana	Idade da lavoura
João Ramalho	4,66	10,4	5,2	0,98	9,60	4,80	16,8	0,6	32,2	1	-22,136289	-50,756884	490	RB867515	1ª Soca
										2	-22,136231	-50,756927	489	RB966928	1ª Soca
										4	-22,136308	-50,756930	489	RB92579	1ª Soca
Paraguaçu Paulista	5,43	5,0	10,5	1,30	15,17	5,17	14,0	0,5	35,5	3	-22,302731	-50,583676	580	RB867515	1ª Soca
Paraguaçu Paulista	5,45	10,2	16,4	2,37	17,00	6,18	14,8	0,0	40,4	11	-22,307150	-50,685457	563	RB92579	1ª Soca
Quatá	5,58	6,1	7,0	0,96	14,31	5,92	14,5	0,9	35,8	6	-22,153620	-50,580430	495	CE2*	Cana-planta
										9	-22,153670	-50,580390	494	CE4*	Cana-planta
										12	-22,151228	-50,576790	491	CE1*	Cana-planta
										16	-22,153690	-50,580440	495	CE3*	Cana-planta
Quatá	5,70	5,0	3,0	0,53	10,67	4,67	11,0	0,0	27,3	8	-22,191161	-50,682404	436	RB867515	1ª Soca
Quatá	5,70	5,0	3,0	0,53	10,67	4,67	11,0	0,0	27,3	10	-22,191110	-50,682444	436	RB92579	1ª Soca
										13	-22,191096	-50,682333	436	RB966928	1ª Soca
Quatá	6,08	12,9	15,9	1,42	17,35	5,71	12,1	0,0	36,6	15	-22,264116	-50,632208	555	RB92579	1ª Soca
Quatá	6,20	10,5	22,2	2,63	18,50	7,33	10,8	0,0	39,3	7	-22,233203	-50,612332	558	RB966928	1ª Soca
Quatá	6,20	17,0	43,5	3,55	19,25	6,75	13,2	0,0	42,7	5	-22,144143	-50,550939	490	RB867515	Cana-planta*
Quatá	6,21	5,3	20,6	1,54	18,00	5,93	11,2	0,0	36,8	14	-22,217306	-50,648372	535	RB966928	1ª Soca

pH: potencial hidrogeniônico em CaCl₂; MO: Matéria orgânica; P-resina: Fósforo avaliado pelo método da resina; CTC: Capacidade de troca catiônica. Dados de análises química dos solos fornecidos pela Zilor – Acucareira Quatá S/A. *: Cana-planta formada com mudas pré-brotadas (MPB); CE: Cana Energia (1, 2, 3 e 4) representam variedades não comercializadas.

2.4.2 Identificação dos isolados de fungos endofíticos septados escuros

A extração de DNA dos isolados foi realizada a partir de discos de 7 mm de diâmetro retirados da margem externa de colônias em crescimento. Cada disco de micélio, com a menor quantidade possível de meio de cultura, foi transferido para um microtubo de fundo cônico com capacidade para 0,5 mL, contendo pérolas de vidro ($\leq 106 \mu\text{m}$, previamente lavadas com água Milli-Q e esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 minutos). Sobre o disco de micélio foram pipetados 200 μL de PrepMan® *Sample Preparation Reagent* (Applied Biosystems) e, com ajuda de pistilos estéreis, procedeu-se a maceração do micélio. A seguir as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos e resfriadas por dois minutos a temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se à centrifugação por 10 minutos a 13000 RPM, sendo o sobrenadante, contendo o DNA extraído, cuidadosamente pipetado e transferido para um novo microtubo, o qual foi conservado em freezer a -20°C .

O DNA extraído foi diluído (1/10) em água ultrapura para PCR e 2 μL da diluição foram usados para cada PCR. A região do espaçador interno transcrito (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal foi amplificada usando os primers ITS1F e ITS4 (White et al., 1990). Os primers LR0R (Rehner & Samuels, 1994) e LR5 (Vilgalys & Hester, 1990) foram usados para amplificar a subunidade ribossomal maior (LSU – *large subunit*), gene 28S, enquanto os primers EF1-728F (Carbone & Kohn, 1999) e EF-2Rd (Groenewald et al., 2013) foram usados para a amplificação parcial do gene referente ao fator de alongamento-translocação 1 α (TEF - *Translation elongation factor*). Os genes da actina (ACT) e β -tubulina (TUB) foram parcialmente amplificados por meio dos primers ACT-512 (Carbone & Kohn, 1999) e ACT-2Rd (Quaedvlieg et al., 2011) e, CYLTUB1F (Groenewald et al., 2013) e Bt-2b (Glass & Donaldson, 1995), respectivamente.

No caso da região ITS, cada reação de PCR teve um volume de 25 μL , contendo 0,2 mM de dNTP, 3 mM de MgCl_2 , 1X *Colorless Gotaq Flexi Buffer* (Promega), 0,625 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega), 0,2 μM de cada primer e 2 μL de DNA genômico. O volume da reação foi completado com 12,875 μL de água ultrapura para PCR. O programa da PCR para a região ITS consistiu em desnaturação inicial a 95°C por dois minutos; 35 ciclos de desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (52°C por 45 segundos) e alongamento (72°C por dois minutos); alongamento final a 72°C por cinco minutos, e manutenção a 4°C até retirada das amostras do termociclador. No caso dos genes LSU, TEF, ACT e TUB seguiu-se os protocolos descritos pela Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção Vegetal (EPPO-Q-bank Database, 2019).

Os produtos das reações de PCR foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 1%. A quantificação foi realizada por meio do Kit Qubit® dsDNA BR Invitrogen. Os produtos de PCR foram purificados utilizando as enzimas Exonuclease I (20U/ μL) e FastAP Fosfatase Alcalina Termossensível (1U/ μL). Para o sequenciamento do DNA, procedeu-se à marcação do DNA com o Kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems™). O produto desta reação foi purificado por precipitação em etanol, prévio à injeção em analisador genético 3500 (Applied Biosystems™).

As sequências obtidas foram processadas no programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd.). Posteriormente, procedeu-se à comparação das mesmas com sequências depositadas na base GenBank® do “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) da “*U.S. National Library of Medicine*” por meio da ferramenta BLASTn 2.8.0 (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) (Zhang et al., 2000; Morgulis et al., 2008). O alinhamento das sequências referentes aos fungos aqui isolados e sequências similares retiradas do GenBank foi realizado utilizando a ferramenta ClustalW no programa MEGA versão X (Kumar et al., 2018). Análises de máxima verossimilhança (ML – *Maximum Likelihood*) foram conduzidas usando o modelo de substituição nucleotídica GTR (*General Time Reversible*). O suporte das ramas foi

verificado por meio de análise de *ML bootstrap* com 1000 réplicas. As análises previamente referidas assim como a visualização e edição das árvores filogenéticas também foram realizadas no programa MEGA versão X (Kumar et al., 2018). Os nomes de espécies foram verificados quanto a sinonímias e nomenclatura mais atual nas bases taxonômicas MycoBank (2019) e Index Fungorum (2019), e os nomes correntes adotados neste trabalho.

A identificação molecular dos isolados foi complementada pela observação da micromorfologia dos isolados. Foram montadas lâminas de microscopia utilizando a técnica de micro cultivo (Ali-Shtayeh et al., 1998). Posteriormente, as preparações foram observadas no microscópio óptico com câmara acoplada, o que permitiu fotografar estruturas típicas de cada isolado ou até mesmo identificar a falta de formação das mesmas por alguns destes.

Os fungos isolados foram preservados utilizando os métodos Castellani e criopreservação. Em ambos os casos se retiraram discos de 5 cm de diâmetro de colônias de aproximadamente 15 dias crescendo em meio MEA. No caso de método Castellani os discos foram transferidos para tubos de 2 mL contendo água destilada estéril, e mantidos em refrigeração (4°C). Para a criopreservação preparou-se uma solução de extrato de malte e glicerina, a qual foi posteriormente esterilizada em autoclave a 121°C. Os discos foram assim transferidos para tubos criogênicos de 2 mL contendo esta solução, e gradativamente congelados (4°C por 1 hora, -18°C por 1 hora) até ser finalmente mantidos a uma temperatura de -80°C. Posteriormente, os isolados preservados foram depositados na coleção de fungos do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Isolados de fungos endofíticos septados escuros

A observação microscópica de raízes permitiu verificar a ocorrência de colonização por fungos do tipo DSE nas plantas de cana-de-açúcar coletadas (Figura 1). Estruturas típicas desta simbiose, como microescleródios melanizados e hialinos (em formação), assim como hifas septadas, foram verificadas no interior das raízes.

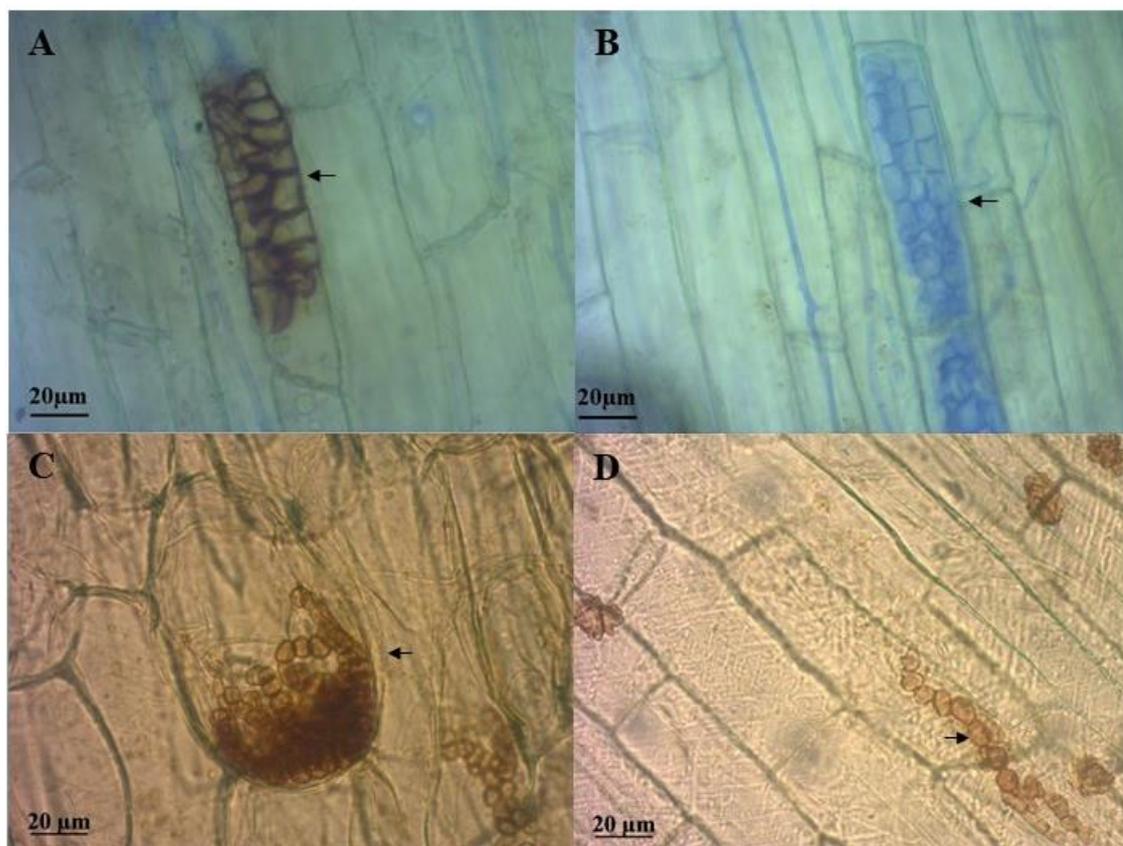


Figura 1. Raízes de cana-de-açúcar colonizadas por endófitos septados escuros. Plantas cultivadas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil e amostradas em julho de 2016. As setas pretas indicam (A) Microescleródio melanizado; (B) Microescleródio hialino após tingimento com azul de metila; (C), (D) Microesclerodios em formação.

A partir das 16 amostras de cana-de-açúcar foram isolados 63 fungos endofíticos radiculares (Tabela 2). Destes, 26 foram da variedade RB966928; 17 de Cana Energia (CE1: sete isolados; CE2: três isolados; CE3: dois isolados; CE4: cinco isolados); 15 de RB867515; e cinco de RB92579. Porém, apenas 16 do total de isolados (25%) apresentaram colônias de cor escura quando cultivados em MEA (27°C), indicando a possibilidade de serem DSE conforme o critério de diferenciação proposto por Grünig et al. (2011). Agrupamentos com base na cor das colônias podem excluir fungos DSE, porém não existem ainda critérios bem estabelecidos para a diferenciação dos fungos integrantes deste grupo (Knapp et al., 2012).

Tabela 2. Variedades de cana, idade da lavoura e número de isolados, total e escuros, obtidos a partir das plantas amostradas em 12 e 13 de julho de 2016 para isolamento de endófitos septados escuros na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil.

Variedade de Cana	Idade da lavoura	Pontos amostrados	Colônias isoladas		
			Total	Escura	Código atribuído*
RB867515	1ª Soca	1	3	2	A111 e A112
RB867515	1ª Soca	3	4	0	-
RB867515	Cana-planta	5	2	0	-
RB867515	1ª Soca	8	6	3	A113 – A115
RB92579	1ª Soca	4	0	0	-
RB92579	1ª Soca	10	0	0	-
RB92579	1ª Soca	11	3	1	A116
RB92579	1ª Soca	15	2	1	A117
RB966928	1ª Soca	2	12	0	-
RB966928	1ª Soca	7	8	4	A118 – A121
RB966928	1ª Soca	13	2	0	-
RB966928	1ª Soca	14	4	2	A122 e A123
CE1	Cana-planta	12	2	0	-
CE2	Cana-planta	6	7	0	-
CE3	Cana-planta	16	5	3	A124 – A126
CE4	Cana-planta	9	3	0	-

*: Códigos referentes à identificação atribuída aos isolados quando depositados na coleção de fungos do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner

A macromorfologia das colônias destes 16 isolados fúngicos pode ser observada na Figura 2. De modo geral, a simbiose com fungos DSE parece ser comum entre as variedades de cana-de-açúcar. Porém, o maior número de isolados de colônia escura foi obtido a partir das raízes das variedades RB966928 e RB867515, com seis e cinco isolados, respectivamente. Na sequência ficaram as variedades CE3 e RB92579 com três e dois isolados cada, respectivamente.

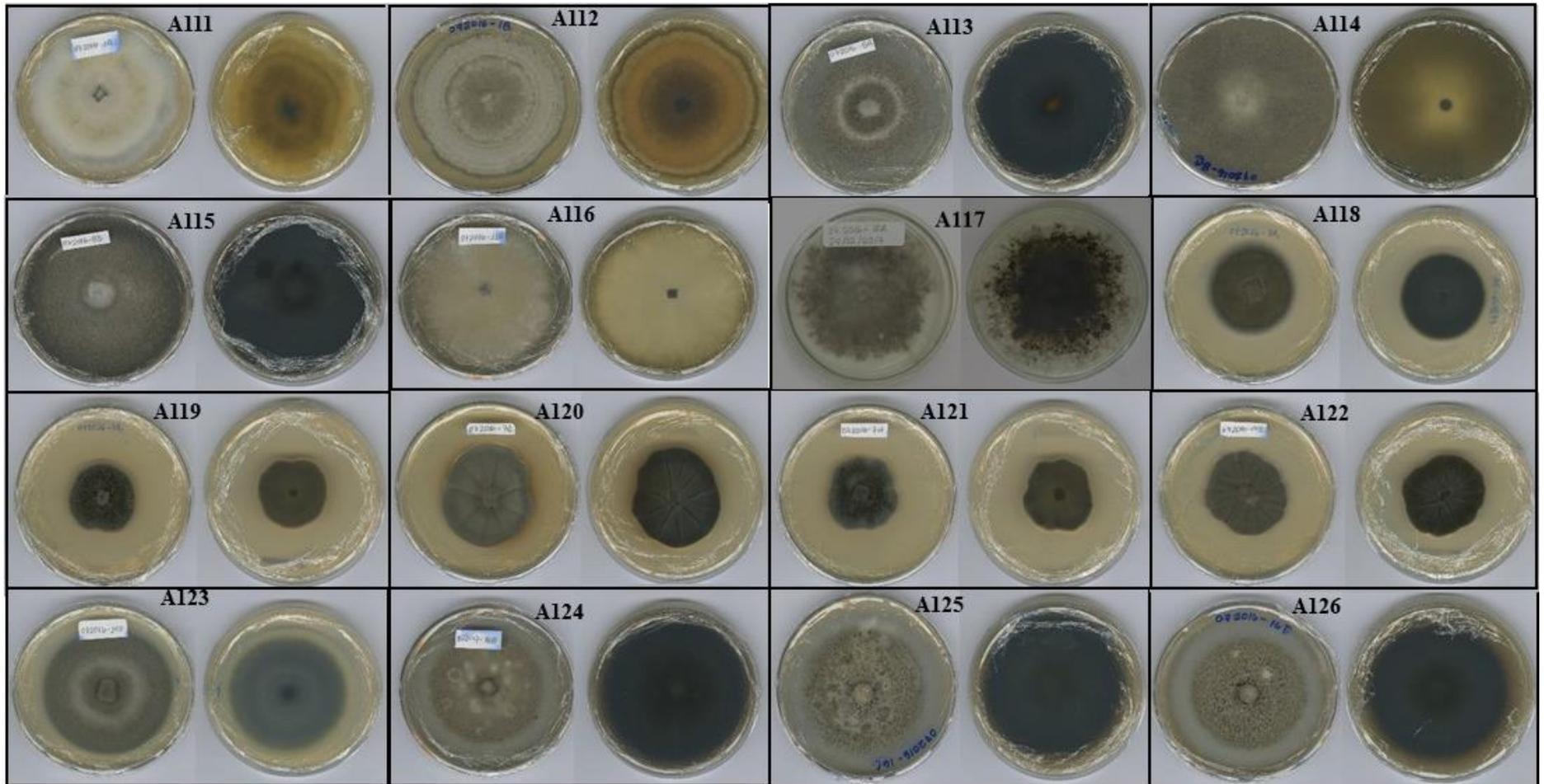


Figura 2. Colônias (a esquerda: vista superior; a direita: vista inferior) de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar cultivadas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Os códigos A111-A126 referem-se à identificação atribuída aos fungos no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner, onde os isolados foram depositados.

Para vários pontos amostrais não foram verificados isolados com aparência de DSE. Limitações referentes ao caráter seletivo do método dependente de cultura utilizado podem ter subestimado a diversidade de DSE associados a estes pontos. Por outro lado, a amostragem de apenas uma planta em cada ponto também pode ter influenciado de forma negativa o número de isolados. Finalmente, a idade das plantas pode ter afetado esse resultado. A maior parte das amostras e isolados derivaram-se de plantas vegetando como primeira soqueira (Tabela 2). Das amostras retiradas de cana-planta, apenas a da variedade CE3 resultou em isolamento de DSE. Claassens et al. (2018), ao avaliar a dinâmica de colonização por DSE em plantas de cana-de-açúcar ao longo do ciclo da cultura (primeira e segunda soqueiras), detectaram diminuição na ocupação radicular por fungos DSE na segunda soca em comparação à primeira. De acordo com Lin et al. (2013) há maior expressão de proteínas associadas a mecanismos de estresse/defesa por parte das plantas de cana na fase de soqueiras. Assim, considerando o grande número de relatos relacionados à importância dos DSE no aumento da tolerância das plantas às condições de estresse (Santos et al., 2017; Li et al., 2019), poderia se inferir que em cana-de-açúcar, as soqueiras podem apresentar maior dependência da simbiose com os DSE.

A observação da micromorfologia dos isolados pré-selecionados como DSE permitiu confirmar a formação de hifas septadas e melanizadas em todos os casos e o agrupamento por características morfológicas semelhantes (Figuras 3, 4 e 5). Os isolados A111, A113, A115, A124, A125 e A126 apresentaram conidióforos de comprimento variável (Figura 3), por vezes parecendo um pedicelo com um único conídio direto sobre a hifa, e outras vezes formando um talo de comprimento variável, podendo ser ramificado, chegando a quase 300 μm de comprimento, contendo de uma a duas dezenas de conídios. Os conídios são redondos, com ornamentações em forma de espinho por toda a volta, com diâmetro médio de 16 μm e com formação enteroblástica fialídica. O isolado A112 (Figura 4) apresentou conidióforo de comprimento menor que 100 μm , contendo menos que uma dezena de macroconídios, os quais contêm em média 4 distoseptos. Os isolados A119, A120, A121, A122 e A123 (Figura 4) apresentaram um espessamento de hifas, formando aparentemente pequenos clamidosporos com 5 – 10 μm de diâmetro, embora não se tenha observado essa estrutura se destacar. O isolado A118 (Figura 5) não apresentou formação de conídios. Apresentou hifas com paredes mais espessas e lobadas, de comprimento variável (15-35 μm), das quais brotaram novas hifas ou estabeleceram anastomoses com outras hifas. Os isolados A114, A116 e A117 apresentaram conidióforos de comprimento variável (Figura 5) suportando de um a três conídios arredondados, negros e lisos, com diâmetro médio de 18 μm .

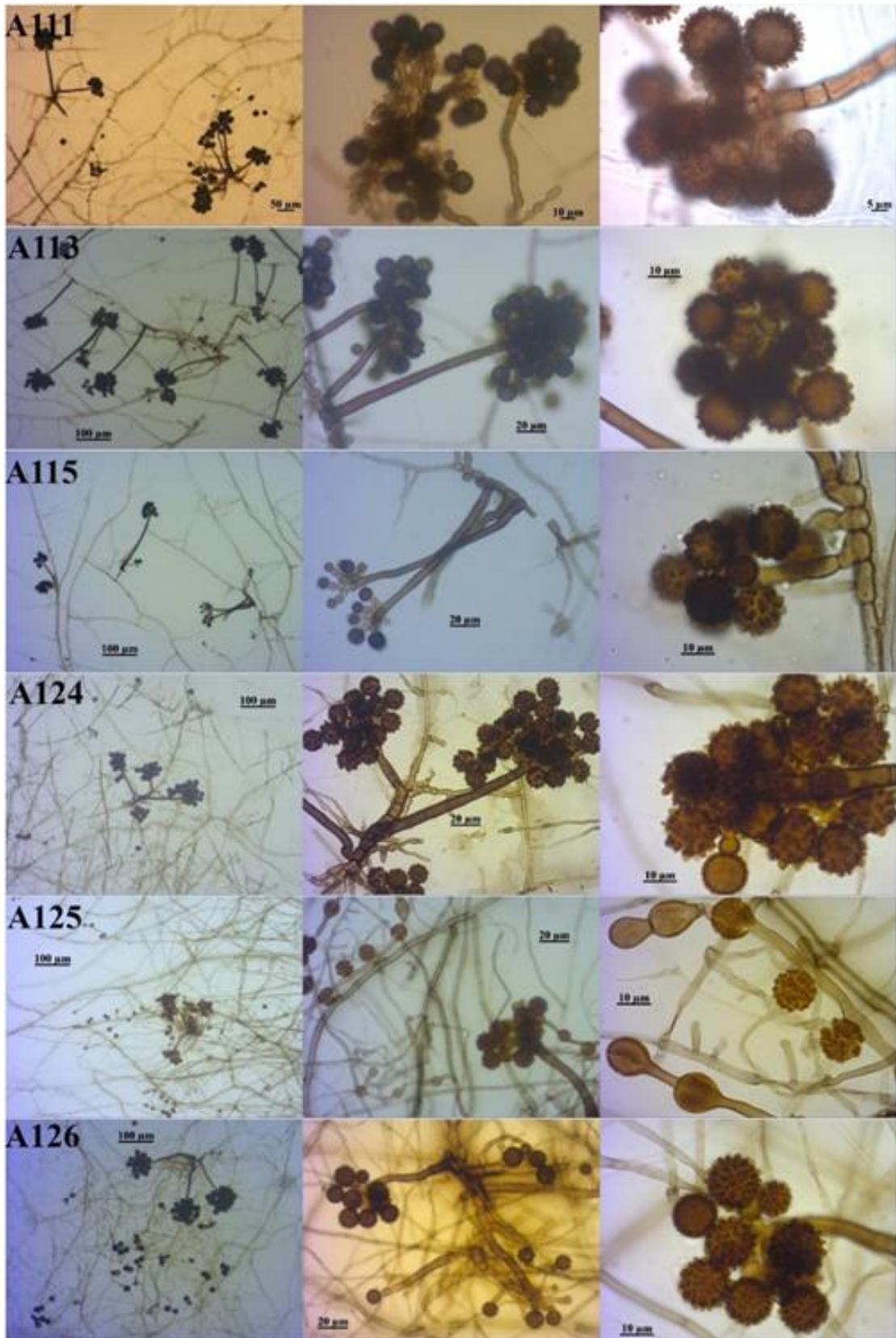


Figura 3. Micromorfologia de hifas e outras estruturas fúngicas em meio extrato de malte-água dos isolados A111, A113, A115, A124, A125 e A126 de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar amostradas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Imagens com ampliação de 100X (1ª coluna), 400X (2ª coluna) e 1000X (3ª coluna).

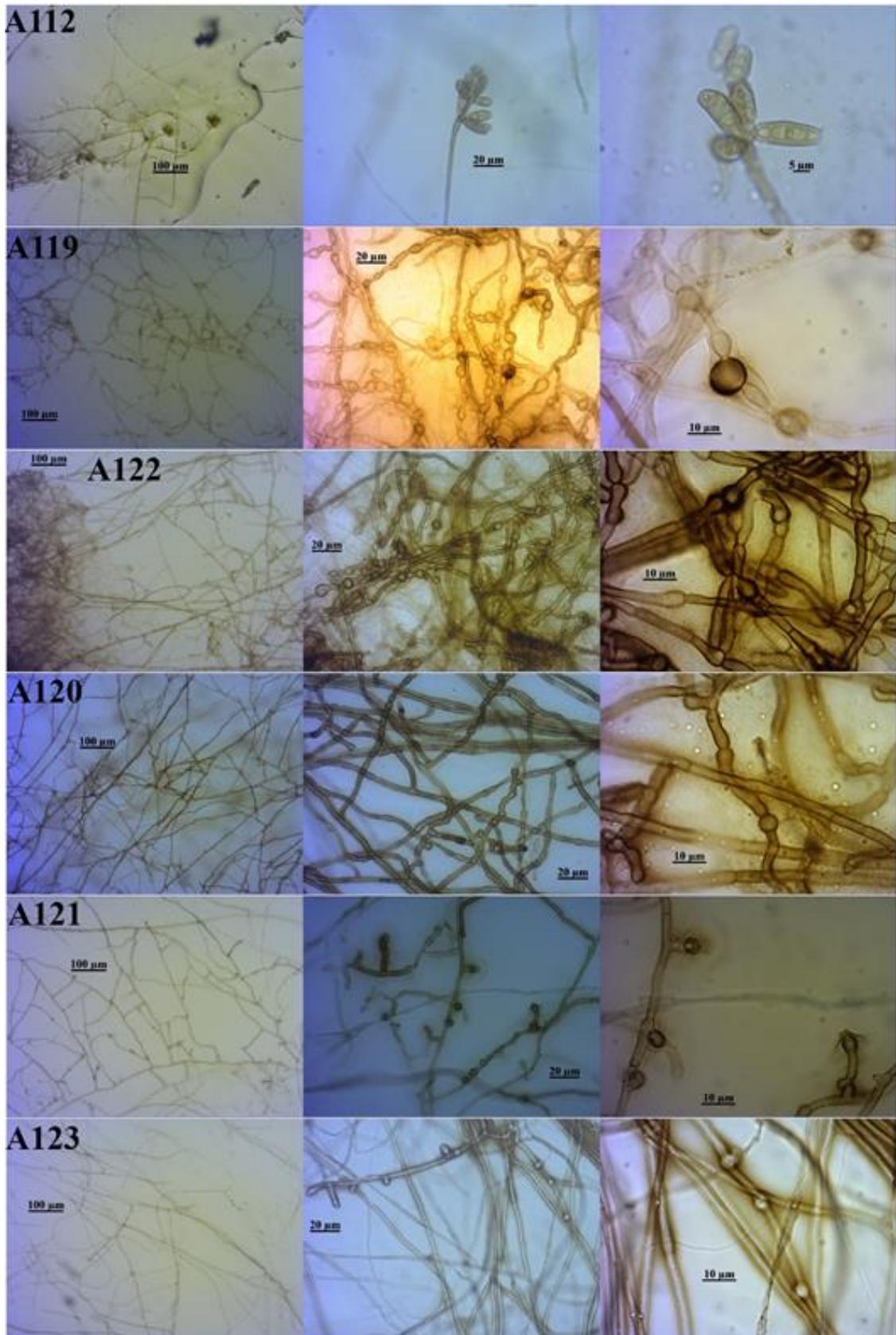


Figura 4. Micromorfologia de hifas em meio extrato de malte-água dos isolados A112, A119, A122, A120, A121 e A123 de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar amostradas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Imagens com ampliação de 100X (1ª coluna), 400X (2ª coluna) e 1000X (3ª coluna).

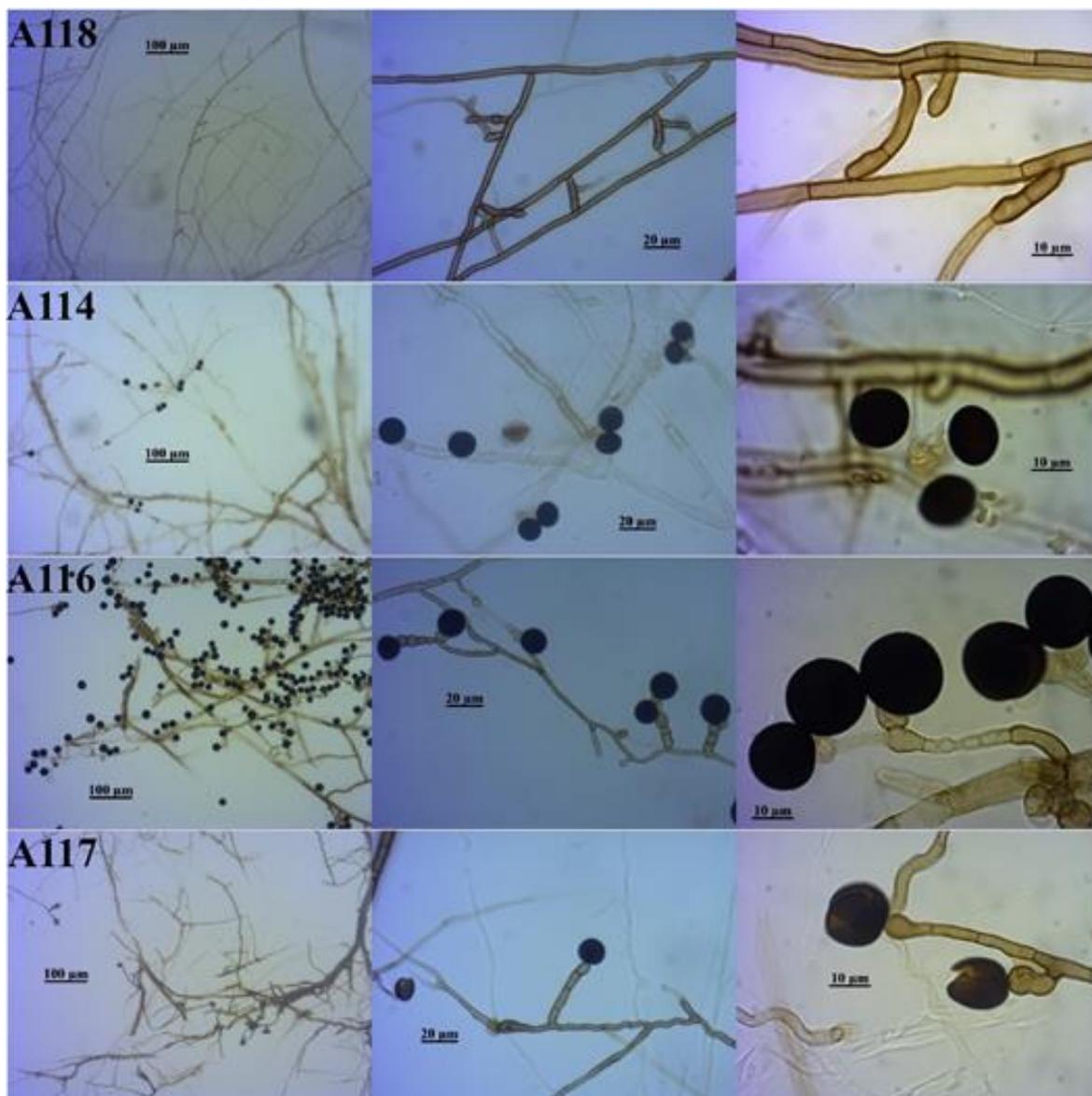


Figura 5. Micromorfologia de hifas e outras estruturas fúngicas em meio extrato de malte-ágar dos isolados A118, A114, A116 e A117 de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar amostradas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Imagens com ampliação de 100X (1ª coluna), 400X (2ª coluna) e 1000X (3ª coluna).

2.5.2 Identificação dos isolados de fungos endofíticos septados escuros

Dos 16 isolados pré-selecionados como DSE foi possível obter as sequências da região ITS para 14 deles. Já no caso da região LSU foram sequenciados com sucesso 11 isolados. Assim, a combinação das características morfológicas e da análise das sequências, permitiu identificar todos os 16 isolados. Desta forma, os 16 isolados de DSE obtidos a partir de raízes de plantas adultas de cana-de-açúcar distribuíram-se em sete grupos quando realizada a análise filogenética das regiões ITS e LSU (Figuras 6 e 7).

O referido agrupamento foi confirmado a partir da análise filogenética das sequências correspondentes às regiões codificadoras dos genes referentes às proteínas ACT, TEF e TUB (Figura 8). Foi amplificado e sequenciado com sucesso o DNA de 13, 13 e 10 isolados para ACT, TEF e TUB, respectivamente. No caso das regiões referentes a ACT e TEF, não foi

possível obter as sequências de três isolados. Sequências referentes a TUB não foram obtidas para seis isolados. A análise de BLASTn das sequências obtidas para ACT, TEF e TUB indicou insuficiência de depósitos em bases de dados para estas regiões no caso de fungos DSE. Algumas regiões codificadoras de genes apresentam melhor gama de distinção quando comparadas à região ITS, atualmente considerada o código de barras universal para fungos (Schoch et al., 2012). Porém, o seu uso é ainda restrito devido à difícil amplificação verificada em alguns casos, assim como à baixa disponibilidade de sequências em bases de dados para cada gene, e o limitado número de espécies que têm sido de fato sequenciadas e depositadas (Samson et al., 2014). Para certos gêneros fúngicos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* a região ITS não permite a diferenciação ao nível de espécie (Raja et al., 2017), e o uso de marcadores moleculares secundários é mais comum (Samson et al., 2014; Visagie et al., 2014). Porém, no caso de espécies de DSE, verifica-se maior número de trabalhos usando apenas a região ITS (Bonfim et al., 2016; Rothen et al., 2017; Baum et al., 2018), sendo escasso ainda o uso de marcadores secundários (Knapp et al., 2015).

Todos os isolados foram classificados como pertencentes ao filo Ascomycota, se diferenciando em três classes e pelo menos cinco famílias e quatro gêneros (Tabela 3). Reconhece-se como um padrão comum a predominância de fungos ascomicetos nas comunidades endofíticas de raízes, podendo se citar como exemplos os trabalhos publicados por Yuan et al. (2010), Knapp et al. (2012), Romão-Dumaresq et al. (2016) e Rothen et al. (2017), entre outros. Particularmente, os fungos DSE, embora constituam um grupo polifilético, estão agrupados dentro desta divisão (Ruotsalainen, 2018). A classe Dothideomycetes, com 12 isolados, foi a melhor representada, seguida de Sordariomycetes e Leotiomycetes com três e um isolado cada, respectivamente.

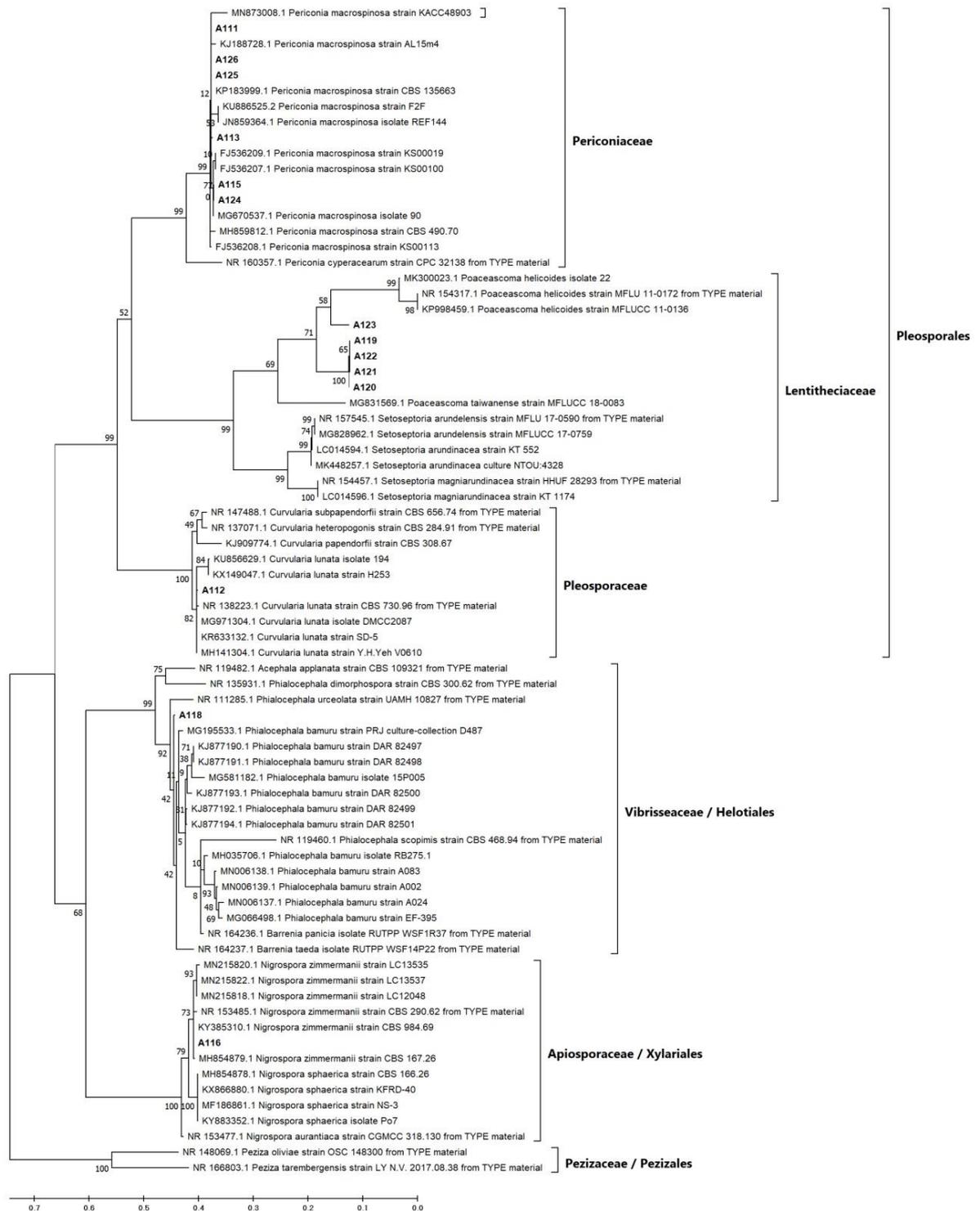


Figura 6. Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de fungos endofíticos septados escuros isolados de cana-de-açúcar e sequências similares depositadas no GenBank. Números nos ramos indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000.

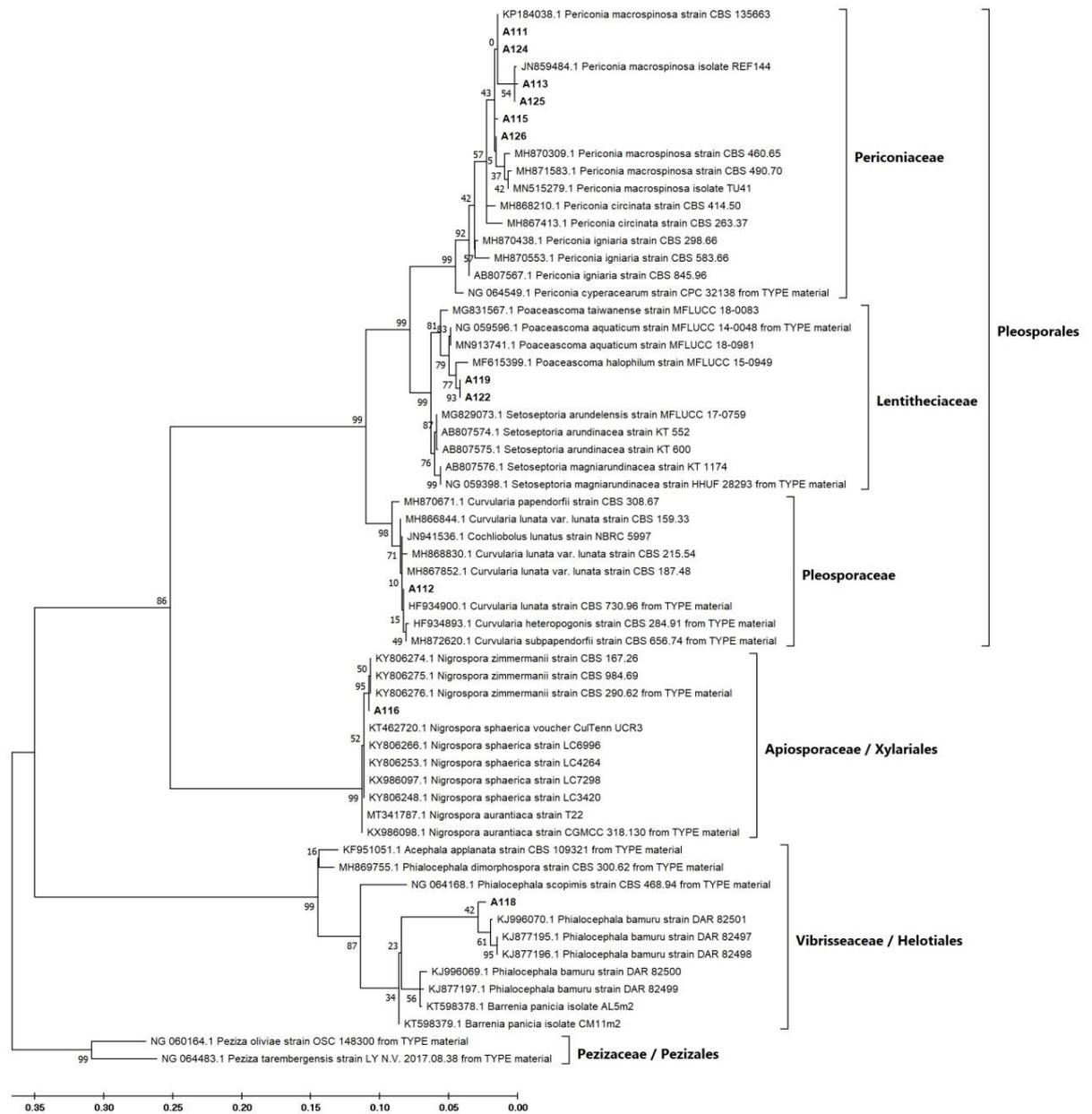


Figura 7. Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região LSU de fungos endofíticos septados escuros isolados de cana-de-açúcar e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000.

Tabela 3. Identificação molecular de endófitos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar amostradas na região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil em julho de 2016.

Código do solado*	Variedade de cana-de-açúcar	Solo**	Identificação proposta, baseada nas análises de BLAST e ML	Gênero	Família	Ordem
Classe Dothideomycetes						
A111	RB867515	1				
A113	RB867515	5				
A115	RB867515	5				
A124	CE3	4	<i>Periconia macrospinosa</i>	<i>Periconia</i>	Periconiaceae	
A125	CE3	4				
A126	CE3	4				
A112	RB867515	1	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia</i>	Pleosporaceae	Pleosporales
A119	RB966928	7				
A122	RB966928	9	Lentitheciaceae	Não identificado	Lentitheciaceae	
A120	RB966928	7				
A121	RB966928	7	Pleosporales	Não identificado	Não identificada	
A123	RB966928	9				
Classe Leotiomyces						
A118	RB966928	7	<i>Phialocephala bamuru</i>	<i>Phialocephala</i>	Vibrissaceae	Helotiales
Classe Sordariomycetes						
A114	RB867515	5	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora</i>	Apiosporaceae	
A116	RB92579	3	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora</i>	Apiosporaceae	Xylariales
A117	RB92579	6	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora</i>	Apiosporaceae	

*: Códigos referentes à identificação atribuída aos isolados quando depositados na coleção de fungos do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner. **: Numeração do solo conforme Tabela 1. ML: *Maximum likelihood analysis* (Análise de Máxima Verossimilhança).

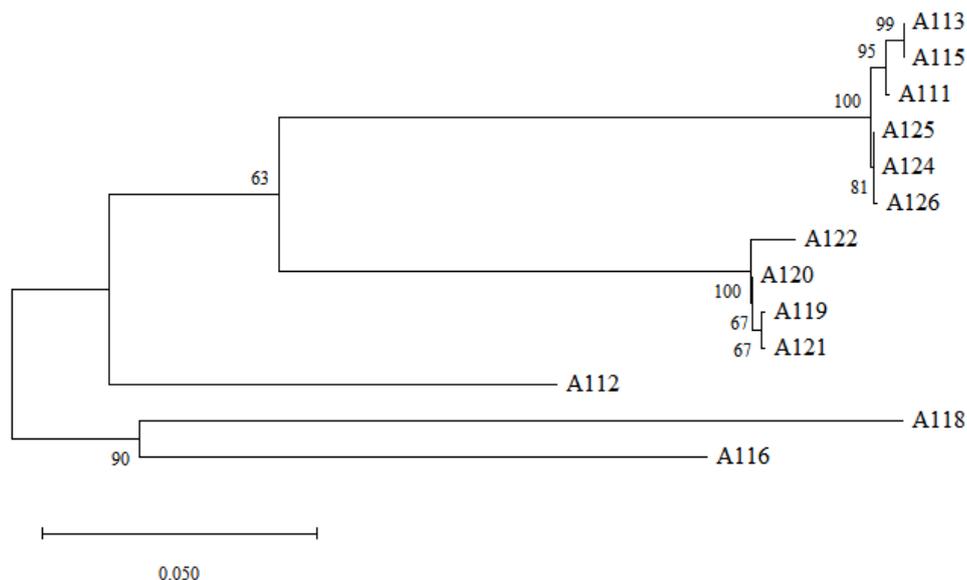


Figura 8. Análise de Máxima Verossimilhança com sequências concatenadas das regiões codificadoras dos genes referentes a ACT, TEF e TUB de fungos endofíticos septados escuros isolados de cana-de-açúcar. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000.

As ordens identificadas – Helotiales, Pleosporales, Xylariales – compreendem espécies mundialmente reconhecidas como DSE (Grünig et al., 2011; Berthelot et al., 2019). Dentre estas ordens, Pleosporales (classe Dothideomycetes) apresentou o maior número de isolados (75%). Estudos prévios, abordando a diversidade de DSE, têm reportado um padrão similar em relação à dominância deste grupo. Rothen et al. (2017) ao estudar a diversidade de DSE associada a duas fases do ciclo da cultura da soja, identificaram 91% dos isolados como integrantes da ordem Pleosporales. Na Mata Atlântica Brasileira, Bonfim et al. (2016) identificaram 43% das OTUs de DSE como pertencentes a esta ordem. Knapp et al. (2012) reportaram que sete dos 14 grupos de DSE verificados associados a gramíneas da Grande Planície Húngara eram representantes da ordem Pleosporales. Na região noroeste do semiárido venezuelano, Loro et al. (2012) ressaltaram a dominância dos gêneros de DSE *Phoma* e *Cochliobolus*, ambos pertencentes à ordem Pleosporales, na comunidade de fungos endofíticos.

Porém, resultados contrários também têm sido publicados. A ordem Hypocreales, ausente no presente trabalho, foi predominante na comunidade endofítica radicular de plantas de soja amostradas no estado de Minas Gerais, Brasil (Fernandes et al., 2015). Em outro estudo, Romão-Dumaresq et al. (2016) avaliaram a comunidade de fungos associados a duas variedades de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil. Os autores indicaram as classes Eurotiomycetes e Sordariomycetes como responsáveis por 43 e 38,5% dos fungos isolados. Diferenças nas características químicas dos solos e nas variedades agrícolas estudadas podem explicar as diferenças entre os resultados obtidos nos diferentes estudos. No presente trabalho, as variedades RB867515 e RB966928 apresentaram isolados de até três famílias diferentes, enquanto as variedades CE3 e RB92579 apresentaram isolados de apenas uma família. A variedade RB966928 coletada no solo 7 resultou em isolados de três famílias diferentes. Além de variedade e solo, outros fatores, como época de amostragem e histórico das áreas podem influenciar a composição das comunidades. Diversos estudos têm abordado o efeito dos referidos fatores nas comunidades microbianas associadas a diferentes espécies vegetais e ecossistemas (Bonito et al., 2014; Silva et al., 2014; Bokati et al., 2016).

De acordo com as Análises de Máxima Verossimilhança das regiões ITS e LSU (Figuras 6 e 7), os isolados A111, A113, A115, A124, A125 e A126 pertencem ao gênero *Periconia*,

mostrando maior afinidade pela espécie *Periconia macrospinosa* e em menor medida por outras espécies do gênero como *P. lateralis*, *P. circinata* e *P. ignaria*. Grünig et al. (2011) cita *P. macrospinosa* como uma das espécies de DSE mais abundantes. Nesse sentido, vários estudos envolvendo diversidade de fungos associados a raízes (*root associated fungi* – RAF) têm verificado a ocorrência de espécies deste gênero, indicando a sua ampla distribuição mundial. Herrera et al. (2013) reportou a ocorrência de *Periconia* sp. como uma das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) melhor representadas dentro da comunidade de RAF de plantas de *Eustachys petraea* amostradas em uma ilha da costa hondurenha. Em pradarias sob regime de queimadas anuais na região centro-oeste dos Estados Unidos, Mandyam et al. (2010) detectaram a espécie *P. macrospinosa* como o endófito radicular de maior frequência de isolamento. Na Grande Planície Húngara, Knapp et al. (2012) reportaram a ocorrência de *P. macrospinosa* associada a raízes de gramíneas características do referido ecossistema.

Destaca-se assim, a ampla distribuição e frequente ocorrência do gênero *Periconia*, e em particular de *P. macrospinosa*, em associação com gramíneas. Considerando a sua importância nas comunidades de DSE, Mandyam et al. (2010) avaliaram o efeito da sua inoculação sob condições controladas. Os autores realizaram ensaios de inoculação *in vitro* de cinco isolados de *P. macrospinosa* em plantas de *Andropogon gerardi* e *Allium ampeloprasum*, confirmando a formação de estruturas típicas de DSE nas raízes, como microescleródios, vesículas hialinas, conidióforos e conídios. De acordo com os resultados obtidos, a produção de biomassa de *A. ampeloprasum* foi influenciada de forma negativa por um dos isolados, enquanto o restante destes apresentou efeito neutro. No caso de *A. gerardi* dois isolados de *P. macrospinosa* estimularam positivamente a produção de biomassa enquanto um outro teve efeito neutro sobre o crescimento das plantas.

O isolado A112 foi identificado como uma espécie do gênero *Curvularia*. Esse gênero, atualmente integrado por pouco mais de 35 espécies, inclui fungos saprofitos e patogênicos (Liang et al., 2018). Porém, espécies de *Curvularia* também têm sido reportadas como endófitos radiculares de gramíneas (Mandyam et al., 2010; Knapp et al., 2012; Loro et al., 2012) e espécies arbóreas de diferentes famílias (Bonfim et al., 2016). Em três ambientes do semiárido venezuelano, Loro et al. (2012) reportaram uma representatividade de entre nove e 19% do gênero *Curvularia* na comunidade endofítica de raízes e folhas de gramíneas e ciperáceas. Do ponto de vista biotecnológico, tem se destacado a importância deste gênero (Bengyella et al., 2019). Avinash et al. (2015) comprovaram o efeito antimicrobiano do extrato de *C. lunata*, destacando o seu potencial uso como inibidor de fungos e bactérias fitopatogênicas. Um outro estudo indicou o efeito de *C. geniculata* na promoção do crescimento de *Cajanus cajan* (feijão guandu), ao mesmo tempo que verificou capacidade solubilizadora de $AlPO_4$, $FePO_4$ e $Ca_3(PO_4)_2$ e produção de ácido indol acético por parte deste fungo.

O isolado A118 mostrou relação próxima com a espécie *Phialocephala bamuru*. O gênero *Phialocephala*, representado principalmente por fungos endofíticos ou saprofitos, inclui importantes integrantes de DSE (Grünig et al., 2011). Particularmente, o complexo *Phialocephala fortinii* – *Acephala applanata* (PAC – *Phialocephala fortinii*-*Acephala applanata* species complex) destaca-se como um dos mais comuns em florestas boreais da América no Norte e Europa (Grünig et al., 2011; Ruotsalainen, 2018). Especificamente, *P. bamuru* é uma espécie recentemente descrita como patogênica das gramíneas *Cynodon dactylon* e *Pennisetum clandestinum* utilizadas em campos de golfe da Austrália (Wong et al., 2015).

É relativamente comum nos estudos de diversidade de RAF, ou DSE em particular, a identificação de isolados somente até o nível de ordem, especificamente Pleosporales (Knapp et al., 2012; Herrera et al., 2013). No presente estudo, os isolados A120, A121 e A123 foram apenas identificados como sendo da ordem Pleosporales. Por outro lado, os isolados A119 e A122 também pertencentes a esta ordem, mostraram-se associados à família Lentitheciaceae.

Os isolados A114, A116 e A117 foram identificados como pertencentes ao gênero *Nigrospora*. Estudos prévios têm reportado a ocorrência de espécies deste gênero como endófitos radiculares de *Moringa oleifera* (Zhao et al., 2012) e espécies arbóreas representativas da Mata Atlântica brasileira (Bonfim et al., 2016). Em outro estudo, o gênero *Nigrospora* representou 8% dos isolados da comunidade endofítica aérea e radicular de plantas amostradas na região noroeste do semiárido da Venezuela (Loro et al., 2012). Bonfim et al. (2016), ao estudar a diversidade de DSE associada às principais espécies arbóreas da Mata Atlântica Brasileira, reportaram este gênero como o único fungo isolado de todos os hospedeiros compreendidos no estudo, destacando a sua importância no ecossistema.

Cabe ressaltar que alguns dos fungos identificados têm sido também documentados como espécies decompositoras de paredes celulares de *Miscanthus* e cana-de-açúcar (Shrestha et al., 2011). Os autores destacaram a ocorrência de *P. macrospinosa* e outras espécies não identificadas pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Nigrospora* e *Phoma*, à ordem Pleosporales e à classe Dothideomycetes. Desta forma, destaca-se a possível função dos DSE na decomposição de resíduos vegetais e consequente disponibilização de nutrientes como P e N para as plantas, como previamente referido na literatura (He et al., 2019). Por outro lado, os gêneros *Curvularia*, *Nigrospora* e *Periconia*, dentre outros, têm sido documentados como endófitos de sementes (cariopses) de cana-de-açúcar (Martins et al., 2009), o qual sugere a possível transmissão vertical destes endófitos, o qual já tem sido comprovado para outros hospedeiros vegetais (Hardoim et al., 2008; Hardoim et al., 2012). Porém, os trabalhos anteriormente publicados envolvendo a diversidade de RAF em cana-de-açúcar (Romão-Dumaresq et al., 2016; Souza, et al., 2016) não têm identificado o gênero *Periconia*, sendo este o primeiro relato da espécie *Periconia macrospinosa* colonizando raízes de cana-de-açúcar no Brasil.

2.6 CONCLUSÕES

A obtenção de 16 isolados de DSE a partir de raízes de quatro variedades de cana-de-açúcar, indica que a simbiose com fungos DSE ocorre naturalmente em plantas da cultura. Fungos DSE associados à cana-de-açúcar incluem integrantes dos gêneros *Curvularia*, *Nigrospora*, *Periconia* e *Phialocephala*, havendo predominância da ordem Pleosporales. A espécie mais comumente isolada de plantas de cana-de-açúcar amostradas em lavouras da região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil é *Periconia macrospinoso*, sugerindo boa adaptação deste fungo à cultura e condições edafoclimáticas da região.

3. CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E DA SOLUBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES POR ENDÓFITOS SEPTADOS ESCUROS ISOLADOS DE RAÍZES DE CANA-DE- AÇÚCAR

3.1 RESUMO

Foi avaliada a promoção de crescimento vegetal por fungos endofíticos septados escuros (DSE). Assim, foram realizados ensaios *in vitro* de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco e inoculação de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (IAC 5000) com 15 isolados de DSE. Conduziu-se também um experimento de co-inoculação de plantas de arroz, variedades BRS Esmeralda e Arroz 70, com três isolados do DSE *Periconia macrospinosa* e um isolado do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus*, sob condições de casa-de-vegetação. Oito dos isolados avaliados solubilizaram zinco, com destaque para dois deles, identificados como *Pleosporales* sp. e *P. macrospinosa*. Porém, nenhum dos isolados testados mostrou-se capaz de solubilizar fosfato. A produção de biomassa aérea das plantas de cana foi negativamente afetada pela inoculação com *Curvularia* sp., *Phialocephala bamuru*, *Lentitheciaceae* sp., *Pleosporales* sp. e *Nigrospora* sp, confirmando que a inoculação de um DSE na mesma espécie vegetal da qual foi isolado não é garantia de promoção do crescimento. Por outro lado, todos os isolados de *P. macrospinosa* estimularam o crescimento das plantas de cana ao tempo que contribuíram na absorção de P. No arroz, a inoculação com *P. macrospinosa* inibiu o crescimento da variedade crioula Arroz 70, ao tempo que teve efeito neutro no crescimento do arroz melhorado BRS Esmeralda. Nesta última variedade a inoculação com *P. macrospinosa* estimulou a absorção de P nas mesmas. Conclui-se que fatores referentes aos genótipos dos simbiontes e da condição ambiental determinam a resposta da planta à inoculação com fungos DSE, destacando isolados de *P. macrospinosa* como potenciais promotores da nutrição vegetal.

Palavras-chave: Fungos endofíticos radiculares. *Periconia macrospinosa*. Inoculação. Cana-de-açúcar. Arroz.

3.2 ABSTRACT

Plant growth promotion by dark septate endophytic fungi (DSE) was evaluated. Thus, *in vitro* assays were performed to evaluate solubilization of calcium phosphate and zinc oxide and the effect of inoculation of sugarcane micropropagated seedlings (IAC 5000) with 15 DSE isolates. A co-inoculation experiment of rice plants of the varieties *BRS Esmeralda* and *Arroz 70* with three isolates of the DSE *Periconia macrospinosa* and one isolate of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* was also conducted under greenhouse conditions. Eight of the isolates evaluated solubilized zinc, two of which were identified as Pleosporales sp. and *P. macrospinosa*. However, none of the isolates tested were capable of solubilizing phosphate. The aerial biomass production of sugarcane plants was negatively affected by inoculation with *Curvularia* sp., *Phialocephala bamuru*, Lentitheciaceae sp., Pleosporales sp. and *Nigrospora* sp., confirming that inoculation of a DSE in the same plant species from which it was isolated is not a guarantee of growth promotion. On the other hand, all *P. macrospinosa* isolates stimulated the growth of sugarcane plants, while contributing to plant P uptake. In rice, inoculation with *P. macrospinosa* inhibited the growth of the Creole variety Arroz 70, while having a neutral effect on the growth of the improved rice variety BRS Esmeralda. In the latter, inoculation with *P. macrospinosa* stimulated P absorption. It was concluded that factors related to the genotypes of the symbionts and environmental conditions determine the response of the plant to inoculation with DSE fungi, highlighting *P. macrospinosa* isolates as potential promoters of plant nutrition.

Key words: Root Endophytic Fungi. *Periconia macrospinosa*. Inoculation. Sugarcane. Rice.

3.3 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial traz o desafio de aumentar a produção de alimentos, e a consequente intensificação do uso de tecnologias agrícolas (Bhatia & Mukherjee, 2018). Porém, os efeitos negativos sobre o ambiente, derivados do uso indiscriminado de insumos químicos na agricultura convencional, são atualmente evidentes (Dubey & Kumar, 2018). Contaminação de solos, eutrofização de corpos de água, emissão de gases de efeito estufa e perda de biodiversidade estão entre os principais problemas resultantes deste sistema (Bhatia & Mukherjee, 2018; Khan et al., 2018). Adicionalmente, deve se destacar o caráter não renovável das fontes de obtenção de alguns destes insumos, por exemplo os fertilizantes fosfatados (Cordell & White, 2011). Assim, mudanças nesses sistemas de produção, capazes de diminuir a sua dependência em insumos químicos, são indispensáveis e urgentes.

Uma das alternativas promissoras para reduzir essa dependência, é o uso das interações naturais entre plantas e microrganismos capazes de estimular o crescimento vegetal (Dubey & Kumar, 2018). A microbiota edáfica e endofítica (de raízes ou parte aérea) é, majoritariamente, composta por bactérias e fungos, que podem estabelecer relações comensalistas ou mutualistas com as plantas, além da possível ocorrência de relações com patógenos latentes (Philippot et al., 2013; Hardoim et al., 2015). Dentre estes microrganismos, aqueles capazes de estimular o desenvolvimento do seu simbionte vegetal são considerados promotores do crescimento de plantas (PGPM – *plant growth promoting microbes*).

A promoção do crescimento de plantas pode se dar através da interação direta entre os PGPM e vegetais, ou de forma indireta a partir da atividade antagonista contra microrganismos fitopatogênicos (Berg, 2009) ou ainda solubilização de nutrientes (Spagnoletti et al., 2017). Segundo Lugtenberg et al. (2013) os PGPM podem ser classificados em três grupos: inoculantes microbiológicos que favorecem a absorção pelas plantas de nutrientes específicos como N, P, Fe, etc.; reguladores do crescimento vegetal capazes de sintetizar e secretar hormônios ou substâncias que estimulam o crescimento das plantas; ou ainda promotores gerais do crescimento, sendo capazes de estimular o desenvolvimento vegetal por meio de vários dos mecanismos diretos ou indiretos citados acima.

Pesquisas envolvendo os fungos endofíticos septados escuros, popularmente conhecidos por seu nome em inglês *dark septate endophytes* (DSE), têm aumentado nas últimas duas décadas, principalmente devido ao seu possível efeito promotor do crescimento vegetal (Berthelot et al., 2019). O grupo é composto por aproximadamente 30 espécies de fungos distribuídos em diversas ordens dentro do filo Ascomycota (Knapp et al., 2015). Como o próprio nome já faz alusão, os DSE apresentam como característica principal a formação de micélio septado e melanizado. Na colonização radicular, além deste tipo de hifas, outras estruturas como microescleródios e clamidósporos podem ser observados (Grünig et al., 2008; Mandyam et al., 2012). Inicialmente, alguns autores sugeriram que os DSE representavam um tipo de fungo micorrízico. Porém a ausência de interface celular e estruturas especializadas para troca de nutrientes entre a planta e o fungo, e a inexistência de evidências concretas de mutualismo entre ambos os simbiontes, diferencia as simbioses micorrízicas da associação entre fungos DSE e plantas (Berthelot et al., 2019).

Diversos estudos ressaltam a ocorrência e importância dos DSE em ecossistemas naturais e agrícolas (Knapp et al., 2012; Bonfim et al., 2016; Rothen et al., 2017). Adicionalmente, resultados derivados de trabalhos de inoculação de plantas com espécies deste grupo fúngico destacam seu potencial na promoção do crescimento vegetal. Dentre os mecanismos confirmados se encontram o aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos, como presença de fitopatógenos, déficit hídrico e contaminação por metais pesados; aumento na absorção de nutrientes como P e N; solubilização de nutrientes; e secreção de enzimas e fitohormônios (Li et al., 2011; Newsham, 2011; Su et al., 2013; Priyadharsini & Muthukumar,

2017; Spagnoletti et al., 2017; Vergara et al., 2017; Prema Sundara Valli & Muthukumar, 2018; Vergara et al., 2018; Li et al., 2019). Porém, a resposta de plantas à inoculação com fungos DSE é altamente dependente do contexto, incluindo condições ambientais, genótipo de ambos os simbioses e estado fisiológico do hospedeiro vegetal (Mandyam et al., 2012; Mandyam et al., 2013). Consequentemente, a interação com esses fungos nem sempre implica uma vantagem para a planta. Desta forma, destaca-se a importância de pesquisas que abordem não apenas o efeito da inoculação com diferentes espécies de DSE, mas também de diferentes isolados fúngicos conespecíficos e genótipos vegetais (Mandyam & Jumpponen, 2015).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial efeito de fungos do tipo DSE, previamente isolados de raízes de cana-de-açúcar, na promoção de crescimento de plantas de cana e duas variedades de arroz, além de avaliar esses isolados quanto a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e óxido de zinco *in vitro*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Inoculação *in vitro* de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar com isolados de endófitos septados escuros

Mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) variedade IAC 5000 foram transferidas para o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado para ¼ da força original, sem vitaminas, hormônios e D-glucose (pH 6,4) e solidificado com ágar (4g L⁻¹). O meio foi esterilizado em autoclave durante 20 min a 121°C e 150 mL foram distribuídos por frasco de vidro (18 cm de altura x 8,5 cm de diâmetro) e uma muda micropropagada foi repicada por frasco.

Durante a repicagem, as mudas foram inoculadas com discos de 5 mm de diâmetro de colônias de diferentes isolados de fungos DSE, previamente cultivadas em extrato de malte-ágar (MEA) por duas semanas. Nas mudas testemunhas não inoculadas colocou-se um disco de MEA estéril. Foram inoculados 15 isolados de fungos DSE previamente identificados com base nas sequências das regiões ITS e LSU (Capítulo 1) como *Periconia macrospinoso* (A111, A113, A115, A124, A125 e A126), *Curvularia* sp. (A112), *Phialocephala bamuru* (A118), *Lentitheciaceae* sp. (A119, A122), *Pleosporales* sp. (A120, A121, A123) e *Nigrospora* sp. (A114, A116). O ensaio foi conduzido em câmara de crescimento com fotoperíodo de 14 horas de luz (luz do dia) e 10 horas de escuro, a uma temperatura média de 23°C. Cada tratamento contou com cinco repetições e o delineamento experimental foi em blocos casualizados.

Passados 60 dias da inoculação, as mudas foram retiradas cuidadosamente do meio. A parte aérea foi separada do sistema radicular. A massa fresca da parte aérea foi quantificada em balança analítica. A massa seca foi avaliada após secagem do material vegetal em estufa (65°C) até atingir peso constante. Uma vez concluída a quantificação de biomassa, a parte aérea das plantas foi finamente triturada para análise da concentração de P conforme a metodologia proposta por Aziz & Habte (1987) com a seguinte modificação. Devido ao pequeno tamanho da parte aérea das plantas de alguns tratamentos, a coleta de discos de folhas foi substituída por três sub-amostras de aproximadamente 0,005 g de material vegetal da parte aérea triturada por planta. A quantidade de P acumulada na parte aérea foi calculada a partir do teor de P na parte aérea e a massa seca da parte aérea. A percentagem de resposta a inoculação foi calculada utilizando a massa seca da parte aérea por meio da fórmula = [(massa seca da planta inoculada – massa seca da planta não inoculada) / massa seca da planta não inoculada] × 100. Essa fórmula foi aplicada a cada dado das parcelas inoculadas com a respectiva testemunha não inoculada do seu bloco, obtendo dados de uma variável calculada passível de análise de variância. No caso de morte da planta referente à parcela inoculada, a massa foi considerada zero para esse cálculo.

Em relação às raízes, avaliou-se o volume radicular (cm³) utilizando o programa WinRHIZO™. Seguidamente, procedeu-se à coloração das raízes e avaliação da presença ou ausência de colonização radicular por parte dos fungos inoculados usando metodologias originalmente propostas para a observação de fungos micorrízicos arbusculares compiladas por Novais et al. (2017).

3.4.2 Inoculação de duas variedades de arroz com três isolados de *Periconia macrospinoso* e um isolado de *Rhizophagus clarus*

Considerando os resultados positivos com a espécie *Periconia macrospinoso* obtidos no experimento de inoculação *in vitro* de mudas micropropagadas cana-de-açúcar, foi realizado um estudo visando avaliar o efeito da inoculação de isolados de *P. macrospinoso* em duas variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). Foram estudadas a variedade melhorada BRS Esmeralda (Colombari Filho et al., 2013) e a variedade crioula Arroz 70 (Araújo, 2010). As sementes de arroz das variedades foram desinfetadas superficialmente pela imersão em hipoclorito de sódio

2% por 10 minutos e três lavagens sucessivas com água destilada (Ferreira, 2017). Posteriormente foram semeadas em areia autoclavada (duas autoclavagens de 60 min a 121 °C em intervalo de 24 horas) e mantidas em sala de crescimento de plantas com fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro, e temperatura de 26°C até a germinação. Duas plântulas de arroz foram transplantadas para cada vaso contendo dois litros de substrato autoclavado (duas autoclavagens de 60 min a 121 °C em intervalo de 24 horas). O substrato foi retirado um Argissolo Vermelho-Amarelo, coletado na georeferência -22,752711° -43,660857°, e que previamente havia recebido calagem e gessagem, apresentando a seguinte análise química da fertilidade: pH 6,7; P = 4,49 mg L⁻¹; K = 29,78 mg L⁻¹; Ca = 2,98 cmol_c dm⁻³; Mg = 1,07 cmol_c dm⁻³; Al = 0,0 cmol_c dm⁻³; H+Al = 0,69 cmol_c dm⁻³; Carbono = 5,3 g dm⁻³ e Nitrogênio = 0,8 g dm⁻³.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (-22,759233° -43,680140°) na Embrapa Agrobiologia, durante 60 dias entre os meses de janeiro e março de 2019. O desenho experimental foi em blocos casualizados com esquema fatorial 2x6, sendo o primeiro fator composto pelas duas variedades de arroz e o segundo fator composto por seis combinações de tratamentos de inoculação dos isolados A111, A113 e A124 de *Periconia macrospinoso* (*Dark Septate Endophytes*) e do isolado A5 de *Rhizophagus clarus* (Fungo Micorrízico Arbuscular) e de adubação completa ou reduzida a 1/3 para o arroz de sequeiro. A combinação de níveis do segundo fator foram: : **(a)** inoculação de *P. macrospinoso* A111 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida (A111+A5); **(b)** inoculação de *P. macrospinoso* A113 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida (A113+A5); **(c)** inoculação de *P. macrospinoso* A124 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida (A124+A5); **(d)** controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação reduzida (A5); **(e)** controle não inoculado com ambos, *P. macrospinoso* e *R. clarus* A5, com adubação reduzida (Ni) e, **(f)** controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação completa (A5+adubo). A adubação foi aplicada semanalmente aos vasos mediante a aplicação de uma solução nutritiva contendo (NH₄)₂SO₄ 500 mM; KH₂PO₄ 6 mM; KCl 1000 mM; Ca(NO₃)₂.4H₂O 1000 mM; MgSO₄.7H₂O 600 mM; C₁₀H₁₂FeN₂NaO₈ 60 mM; H₃BO₃ 30 mM; CuSO₄.5H₂O 2 mM; ZnSO₄.7H₂O 0,5 mM; CoCl₂.6H₂O 0,1 mM e Na₂MoO₄.2H₂O 0,04 mM. Na adubação reduzida foram aplicados 100 mL da solução nutritiva por semana em cada vaso, e na adubação completa 300 mL/vaso/semana. Cada tratamento contou com cinco repetições.

Para a obtenção do inóculo dos isolados de *P. macrospinoso* foi retirado um disco de 5 mm de diâmetro de colônias em crescimento e utilizado para inocular 150 mL de meio extrato de malte líquido, o qual foi incubado em agitação constante (170 RPM) a uma temperatura de 27°C por um período de 10 dias. Na véspera da inoculação, procedeu-se a preparação do inoculante, a qual consistiu na separação do fungo do meio de cultura, trituração e suspensão em água. Para isso em uma capela de fluxo laminar a massa de micélio das culturas foi transferida com uma pinça a um tubo tipo Falcon de 50 mL estéril, o qual foi preenchido com água destilada estéril e centrifugado para precipitação do micélio por seis minutos a 6000 RPM, drenando-se o sobrenadante. Após o descarte do sobrenadante, a massa micelial foi transferida para um copo de liquidificador novo (primeiro uso) esterilizado pela exposição a luz UV. Utilizou-se um copo novo para cada isolado de DSE. Junto com a massa micelial foram adicionados 200 mL de água destilada estéril e o micélio foi triturado em liquidificador na velocidade mínima por 20 segundos (Arno Optimix Plus LN27). Essa suspensão foi armazenada a 5°C e utilizada para inocular as plantas no dia seguinte.

O inóculo de *R. clarus* A5 foi fornecido pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) oriundo do vaso de cultivo 1597 que continha 137 esporos por grama de solo. A espécie foi escolhida com base no seu caráter generalista, sendo capaz de se associar a diversas espécies vegetais e estar presente naturalmente em diferentes ecossistemas. Os esporos foram separados do solo por peneiramento e centrifugações, de acordo com metodologias de

extração de esporos de fungos micorrízicos do solo descritas em Novais et al. (2017). Após a extração os esporos de *R. clarus* A5 foram submetidos a quatro sessões de ultrassom por 15 segundos, intercaladas por lavagens em água destilada estéril para eliminar sujidades e microrganismos superficialmente aderidos nos esporos (Novais et al., 2017). Os esporos foram então suspensos em água destilada estéril em uma concentração média de 80 esporos/mL e armazenados a 5°C para inocular as plantas no dia seguinte. A inoculação das plântulas de arroz foi realizada na cova de transplântio, através da pipetagem das suspensões inoculantes sobre as raízes. Cada planta de arroz foi inoculada com 0,5 mL de inoculante de um dos isolados de *P. macrospinosa* e 1 mL de inoculante de *R. clarus* A5. Imediatamente após o plantio do experimento foi montado um bioensaio de diluição em série e contagem de colônias em placas para quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) dos inoculantes dos isolados de *P. macrospinosa*, o que resultou em $2,2 \cdot 10^{-5}$ UFC/mL do isolado A111; $2,6 \cdot 10^{-5}$ do isolado A113 e $3,3 \cdot 10^{-5}$ UFC/mL do isolado A124.

Foram realizadas medições dos parâmetros agrônômicos das plantas aos 30 e 55 dias após a inoculação, que incluíram a altura do caule até a inserção da folha +1, a largura e comprimento da folha +1, o número de folhas totalmente expandidas e o número de perfilhos. Passados 60 dias da inoculação procedeu-se à coleta das plantas, sendo então avaliados o peso fresco e seco da parte aérea. O material da parte aérea foi moído em moinho tipo Willey para análise do teor de nutrientes no tecido visando avaliar o estado nutricional das plantas (Nogueira & Souza, 2005). Em relação às raízes foi mensurado o volume radicular (cm^3) por meio do método de deslocamento do volume de água na proveta (Neto et al., 2011). Posteriormente, retiraram-se 0,5 g de raízes finas, as quais foram processadas para avaliação, em microscópio estereoscópico, da colonização radicular por parte dos fungos inoculados, conforme as metodologias ilustradas por Novais et al. (2017). O restante do sistema radicular foi secado em estufa a 65°C para quantificação do peso seco de raiz (g).

3.4.3 Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco *in vitro* por isolados de endófitos septados escuros

Foi avaliada a capacidade de 15 isolados de fungos DSE, previamente isolados de raízes de cana-de-açúcar, em solubilizar fosfato e zinco *in vitro*. Os isolados utilizados foram previamente identificados com base nas sequências das regiões ITS e LSU (Capítulo 1) como *Periconia macrospinosa* (A111, A113, A115, A124, A125 e A126), *Curvularia* sp. (A112), *Phialocephala bamuru* (A118), Lentitheciaceae sp. (A119, A122), Pleosporales sp. (A120, A121, A123) e *Nigrospora* sp. (A114, A116).

Para o ensaio de solubilização utilizou-se o meio de cultura NBRIP sólido (*National Botanical Institute's phosphate solubilizing medium*) conforme a metodologia proposta por Nautiyal (1999). No caso da solubilização de fosfato foram acrescentados ao meio 5 g L^{-1} de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como única fonte de P, enquanto para medir a solubilização de Zn acrescentaram-se $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de óxido de zinco (ZnO) como única fonte de Zn. O pH do meio, em ambos os casos, foi ajustado para 6.

Os fungos foram assim inoculados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio NBRIP. Realizaram-se quatro repetições por isolado para os testes de solubilização de fosfato e zinco, respectivamente. A capacidade de solubilização foi reconhecida através da formação de halo translúcido em torno da colônia fúngica em crescimento. O diâmetro de cada colônia e do halo de solubilização (quando formado) foram medidos após sete dias, e a partir destes valores calculou-se a eficiência relativa de solubilização dos isolados, conforme Sunithakumari et al. (2016), pela relação diâmetro do halo/diâmetro da colônia x 100.

3.4.4 Análise dos Dados

Os pressupostos de normalidade e homogeneidade dos resíduos foram verificados para todas as variáveis avaliadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, utilizando o programa estatístico R Studio (R Core Team, 2018). Variáveis que não atenderam alguma dessas presunções foram transformadas com a função $\text{Log}(x)$ ou $\text{Log}(x+1)$. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR 5.6 (Ferreira, 2014) para avaliar a existência de diferenças entre os tratamentos (teste F, $p \leq 0,05$). Seguidamente, nos casos onde estas foram constatadas, procedeu-se à comparação de médias por meio do teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Inoculação *in vitro* de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar com isolados de endófitos septados escuros

Nas Figuras 9 e 10 são apresentados os valores médios de produção de biomassa aérea fresca e seca de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade IAC 5000, 60 dias após a inoculação com 15 fungos endofíticos septados escuros. Isolados de *Curvularia* sp. (A112), *P. bamuru* (A118), Lentitheciaceae sp (A119, A122), Pleosporales sp. (A120, A121, A123) e *Nigrospora* sp. (A114, A116) tiveram efeito negativo sobre a produção de biomassa aérea das plantas. Por outro lado, a inoculação com isolados de *P. macrospinosa* (A111, A113, A115, A124, A125, A126) teve uma tendência neutra a positiva sobre o desenvolvimento vegetal aéreo em comparação ao controle não inoculado.

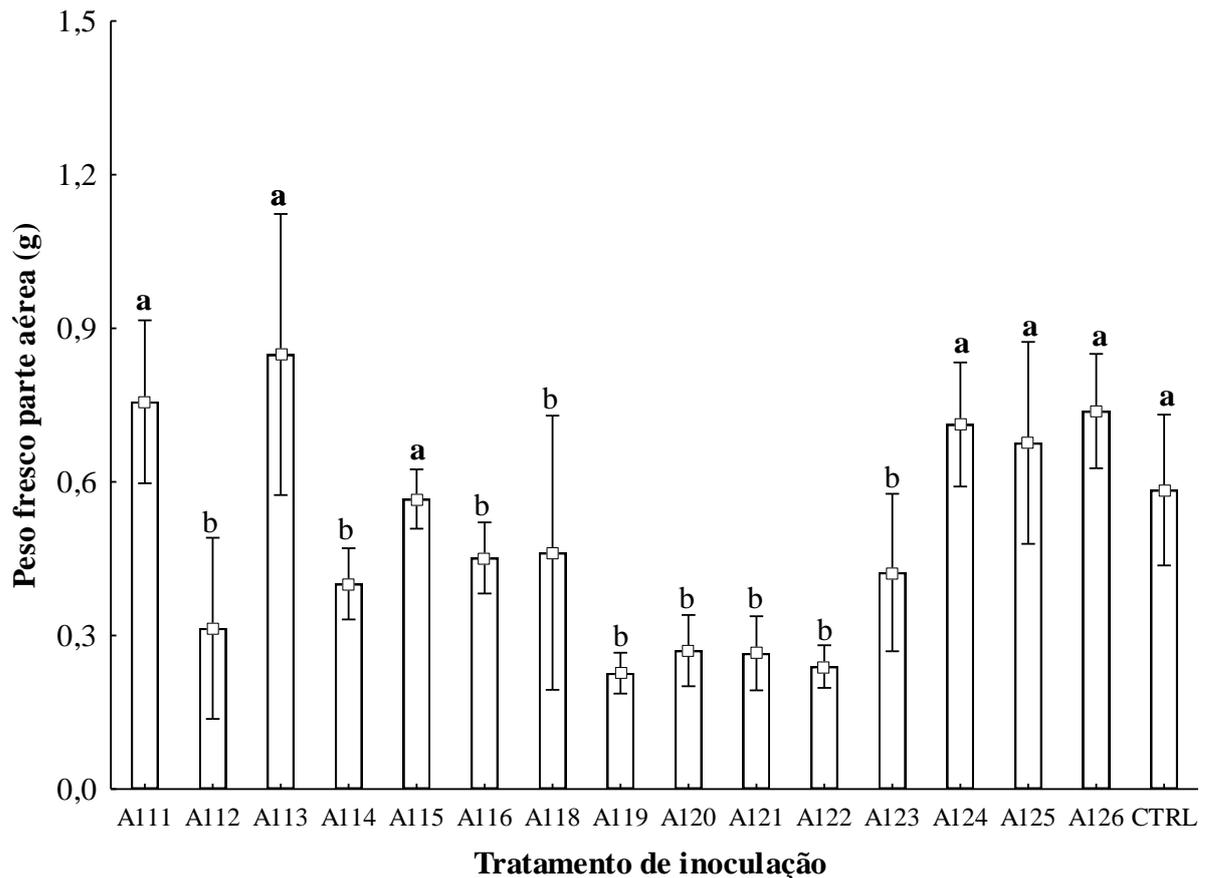


Figura 9. Valores médios (\pm erro padrão) do peso fresco da parte aérea de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação com 15 isolados de endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado.

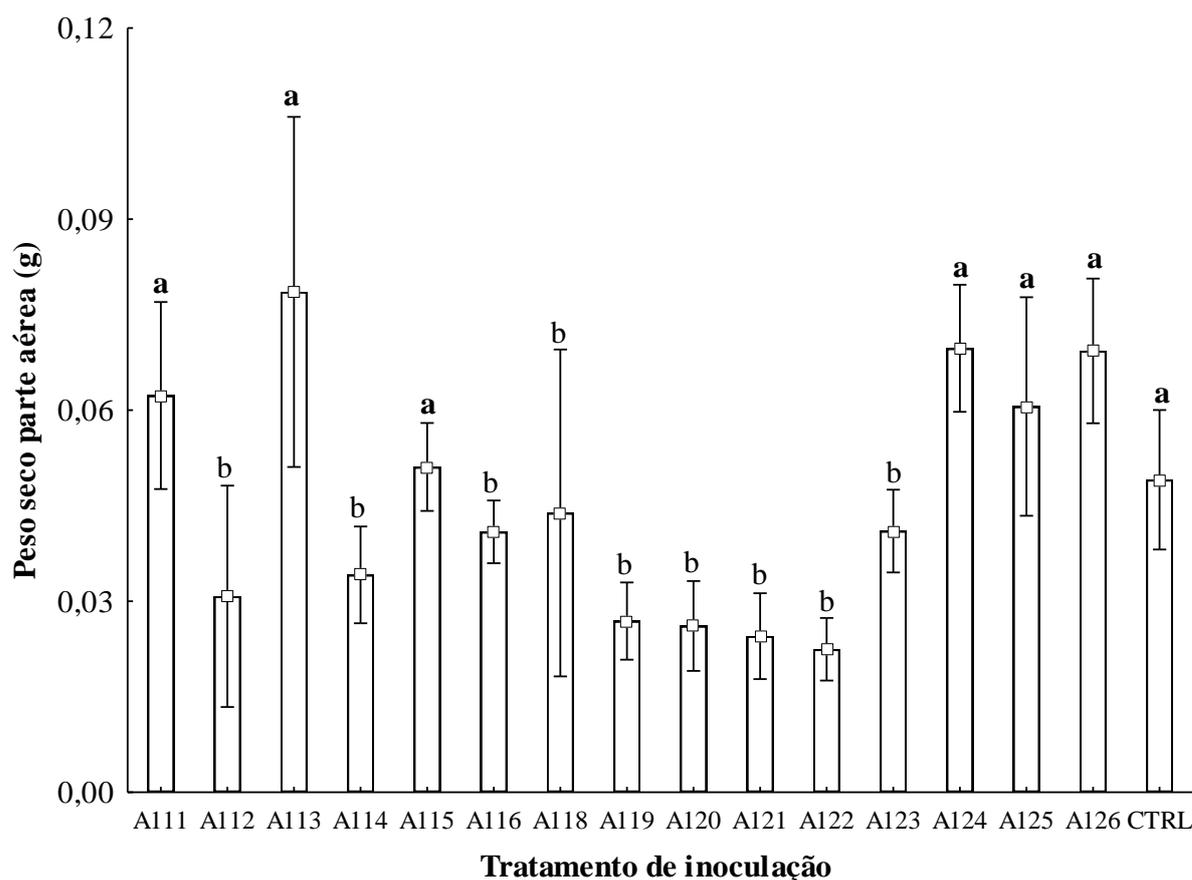


Figura 10. Valores médios (\pm erro padrão) do peso seco da parte aérea de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação com 15 isolados de endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado.

A percentagem de resposta à inoculação é apresentada na Figura 11, onde se verificam respostas positivas e significativamente superiores aos demais tratamentos de inoculação para todos os seis isolados de *P. macrospinoso* (A111, A113, A115, A124, A125, A126). Embora, estatisticamente a resposta à inoculação não diferiu entre os isolados de *P. macrospinoso*, as respostas dos isolados A111 e A124 (99,36 e 96,31%) foram praticamente o dobro em comparação ao isolado A115 (48,03%). Os demais isolados testados, a exceção do A118 (*P. bamuru*) induziram respostas positivas baixas (A116 e A123) ou negativas (A112, A114, A121, A119, A120, A122) à inoculação. Entretanto, deve-se ressaltar que excluindo a diminuição de sobrevivência das plantas inoculadas com os isolados A112 (*Curvularia* sp.) e A122 (Lentitheciaceae), não houve sintomas visíveis de patogenicidade associados à inoculação dos isolados avaliados.

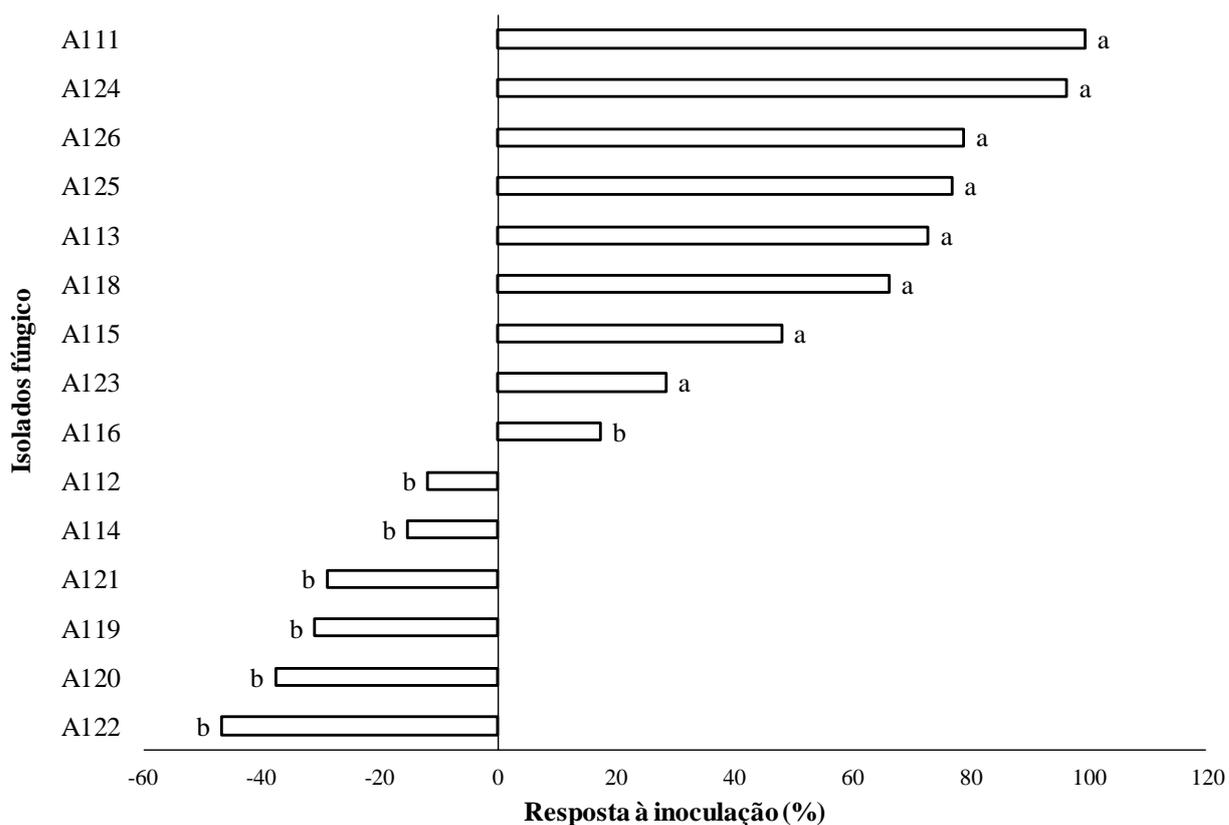


Figura 11. Resposta à inoculação em relação ao controle não inoculado de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) inoculadas com 15 isolados de endófitos septados escuros (A11-A126) em função do peso seco da parte aérea das plantas. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A análise estatística dos dados de volume radicular não apontou diferenças entre os tratamentos de inoculação (Figura 12). O volume das raízes variou de menos que $0,02 \text{ cm}^3$ (A122) a mais que $0,257 \text{ cm}^3$ (A118, A126, A113 e A111). Devido à pouca produção de raízes por parte de algumas plantas, a colonização radicular não foi quantificada, sendo conferida apenas a ocorrência ou não de estruturas fúngicas nas raízes, como hifas septadas, microescleródios ou clamidósporos. Os isolados A111, A116, A1120, A121 e A124 apresentaram estruturas fúngicas nas raízes de todas as repetições (100%). Os isolados A112, A113, A114, A115, A118 e A125 apresentaram estruturas fúngicas em 80% das repetições. O isolado A126 e A122 em 60 e 40% das repetições, respectivamente. No isolado A123 e no controle não inoculado não foram observadas estruturas fúngicas nas raízes.

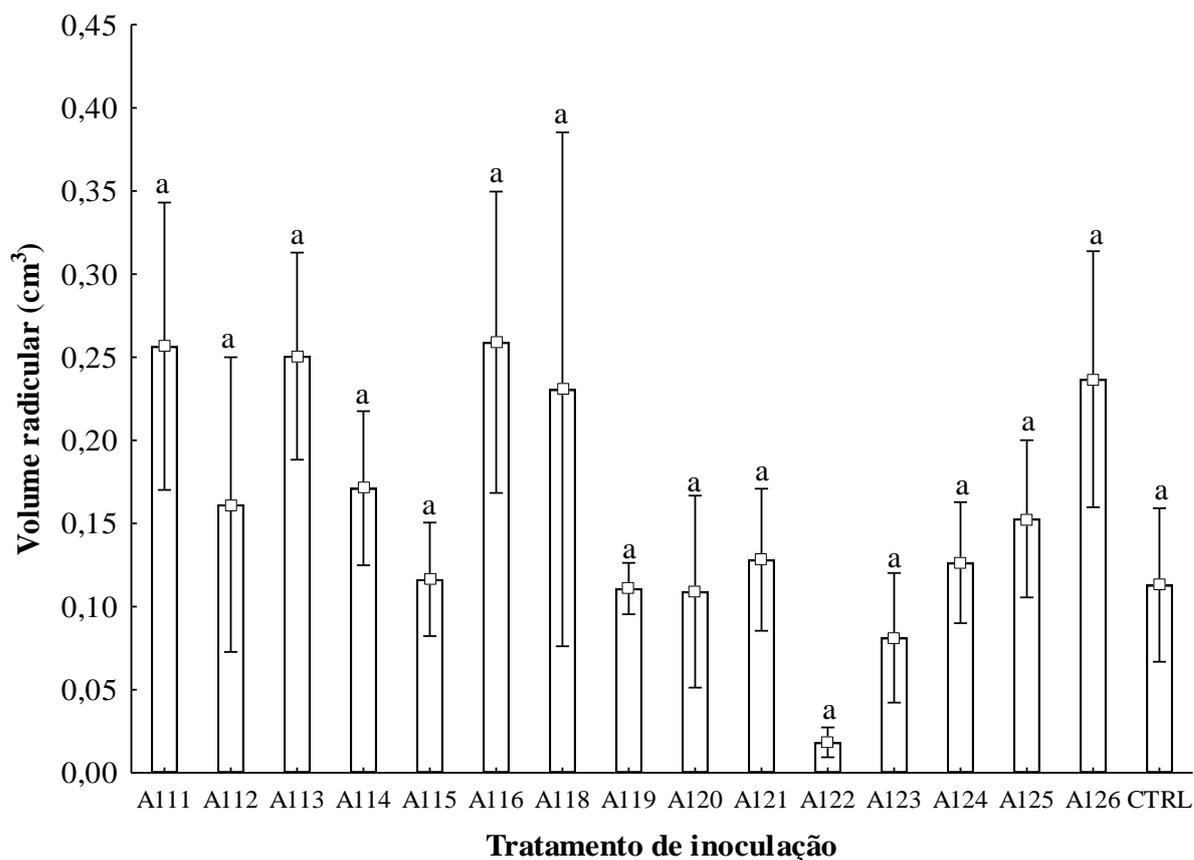


Figura 12. Valores médios (\pm erro padrão) do volume radicular de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação com 15 isolados de endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado.

Colonização radicular mais abundante foi constatada com a inoculação de *P. macrospinosa*, principalmente nas plantas inoculadas com os isolados A111, A115 e A124, onde foram observados segmentos de raízes com alta densidade de microescleródios melanizados e menos frequentemente hifas septadas (Figura 13 G-I). Outros isolados que ocuparam de forma densa pontos das raízes de cana foram *Curvularia* sp. (A112) e *Nigrospora* sp. (A116), ambos responsáveis por diminuições na produção de biomassa e por baixa resposta das plantas à inoculação (Figuras 9, 10 e 11). A colonização por *Curvularia* sp. caracterizou-se por densa formação de microescleródios em certos pontos das raízes, ocupando células radiculares praticamente na sua totalidade (Figura 13 A-C). Já no caso de *Nigrospora* sp. verificaram-se hifas melanizadas com septos curtos, além de abundante formação de conidióforos escuros, típicos das espécies deste gênero, ao redor das raízes (Figura 13 D-F).

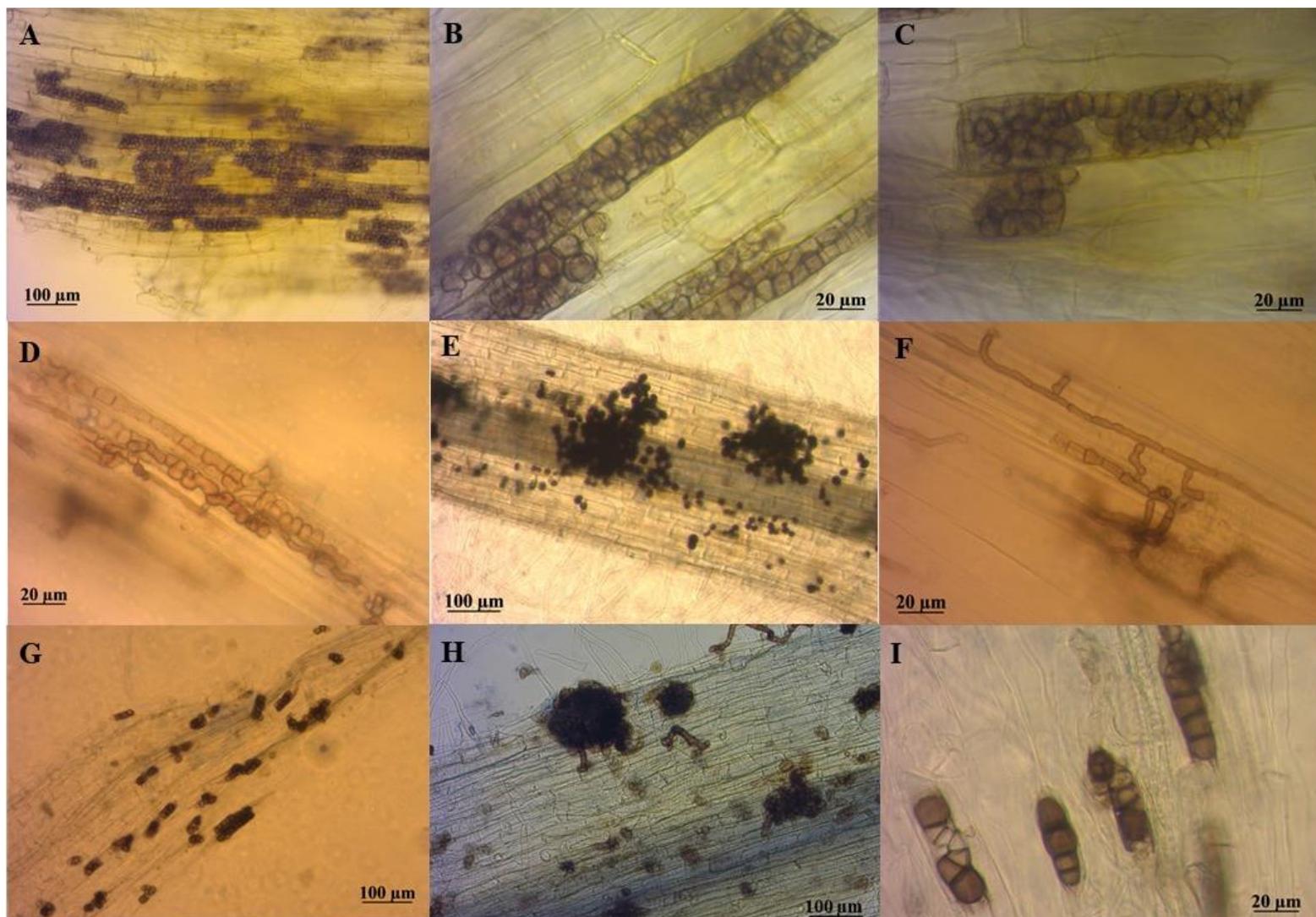


Figura 13. Colonização radicular de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar IAC5000 60 dias após inoculação *in vitro* com os endófitos septados escuros *Curvularia* sp. (A-C), *Nigrospora* sp. (D-F) e *Periconia macrospinoso* (G-I) previamente isolados da própria cultura.

O teor de P e a quantidade de P acumulada na parte aérea são apresentados nas figuras 14 e 15. O teor de P não apresentou diferenças entre os tratamentos de inoculação, apesar do teor no isolado A116 (maior teor) ser 68% superior ao do isolado A118 (menor teor). Essa igualdade no teor de P indica que o meio de cultura foi capaz de nutrir de forma igualitária os tratamentos. Entretanto, a quantidade de P acumulada na parte aérea mostra que os seis isolados de *P. macrospinosa* (A111, A113, A115, A124, A125, A126) e o isolado A116 (*Nigrospora* sp.) promoveram maior acúmulo de P que os demais tratamentos.

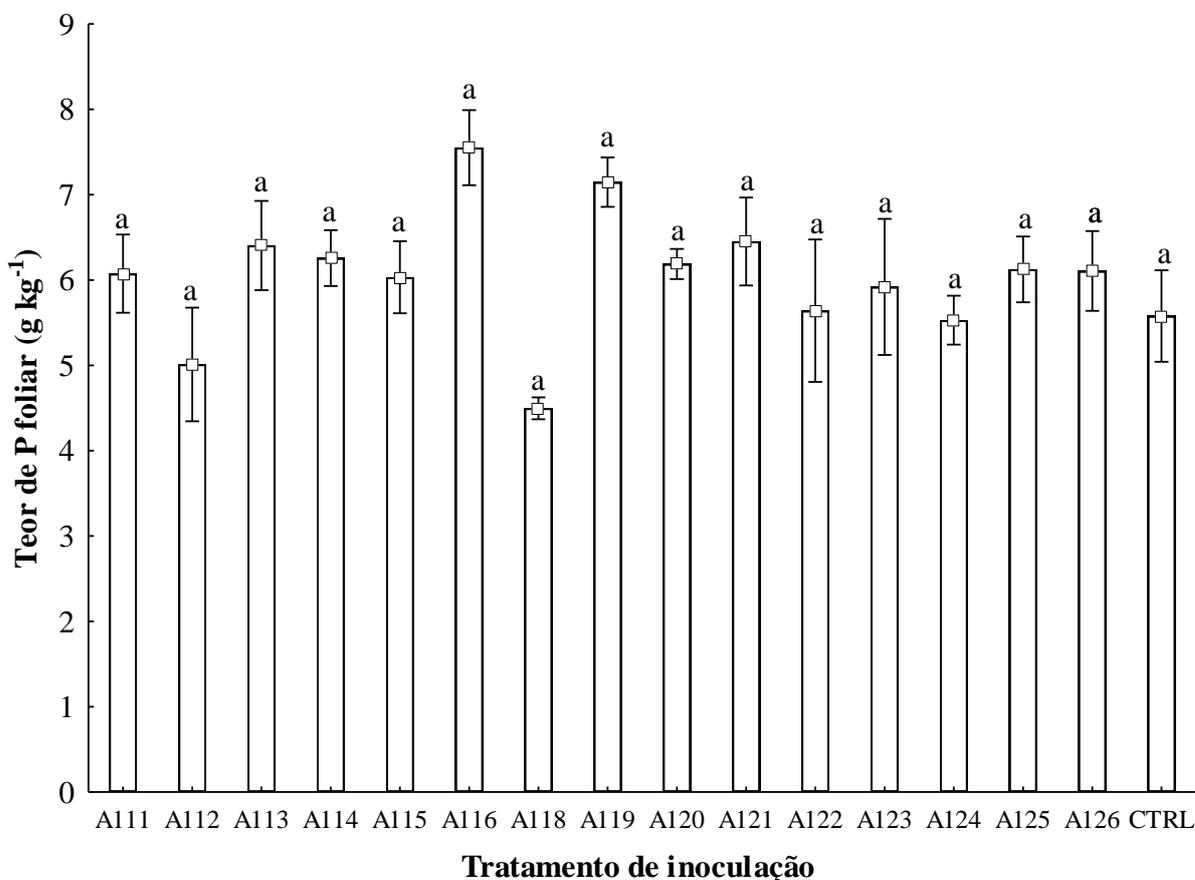


Figura 14. Teor de fósforo foliar de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação *in vitro* com endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado.

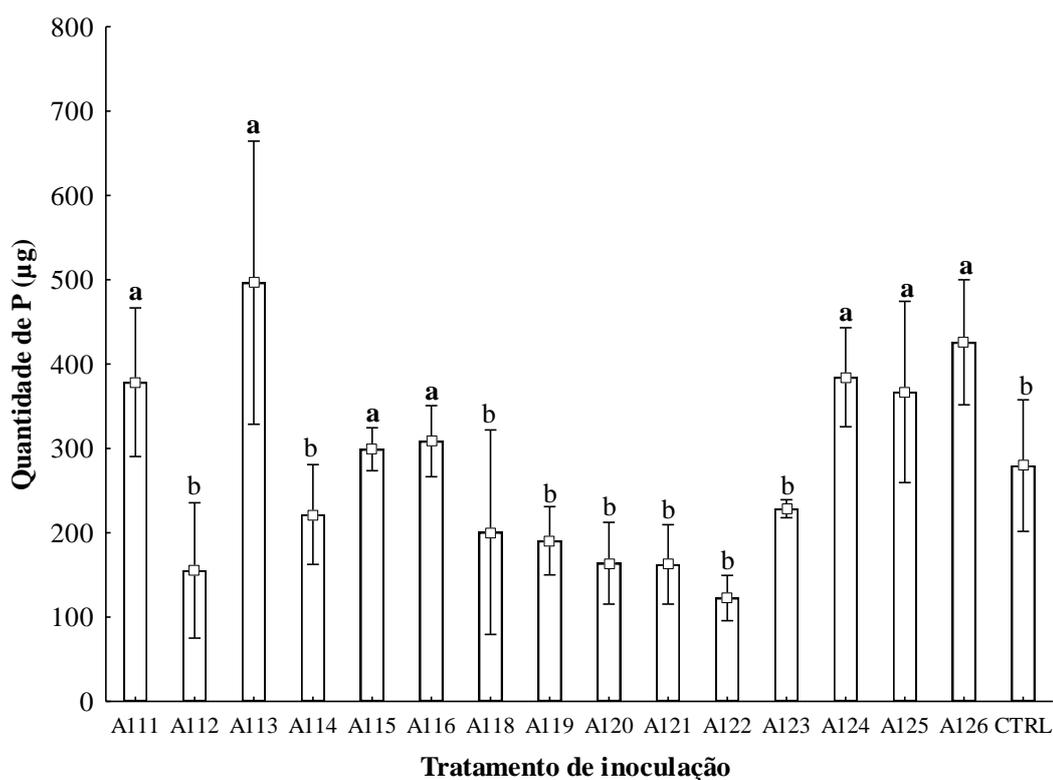


Figura 15. Quantidade de fósforo foliar de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (Variedade IAC 5000) 60 dias após inoculação com endófitos septados escuros (A111-A126). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo test de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Ctrl representa o tratamento controle não inoculado.

3.5.2 Inoculação de duas variedades de arroz com três isolados de *Periconia macrospinoso* e um isolado de *Rhizophagus clarus*

De modo geral, a avaliação das características agrônômicas das plantas de arroz passados 30 e 55 dias da inoculação evidenciou maior crescimento, para todas as variáveis das plantas da variedade crioula Arroz 70 em relação à variedade melhorada BRS Esmeralda (Figura 16, Tabela 4). Na primeira avaliação, 30 dias após a inoculação, na variedade crioula Arroz 70 os tratamentos não inoculados com *P. macrospinoso* mostraram valores significativamente maiores para altura da planta e largura e comprimento da folha +1 em comparação aos tratamentos inoculados. Dentre os três isolados de *P. macrospinoso* testados, A113 foi o que mais inibiu o crescimento em altura das plantas e o número de folhas. Já a variedade melhorada BRS Esmeralda apresentou maiores valores para essas variáveis no tratamento com adubação completa. Assim, essa variedade mostrou-se mais responsiva à adubação do que à inoculação. Na segunda avaliação, 55 dias após a inoculação, na variedade Arroz 70, o efeito da inoculação de *P. macrospinoso* sobre o crescimento em altura das plantas e largura e comprimento da folha +1 se manteve, mas o número de folhas somente foi estimulado pela adubação completa. Para a variedade BRS Esmeralda, a resposta à adubação completa se acentuou em todas as variáveis de crescimento medidas, inclusive no número de perfilhos.

O maior crescimento da variedade Arroz 70 em relação à BRS Esmeralda foi igualmente constatado para a massa da parte aérea e raízes e o volume radicular (Tabela 5). Foram verificados maiores valores destas variáveis para ambas as variedades de arroz no tratamento com adubação completa comparado aos demais tratamentos que receberam apenas 1/3 da adubação de arroz de sequeiro. Na variedade Arroz 70 o efeito negativo da inoculação com os

três isolados de *P. macrospinosa* sobre o crescimento vegetal foi confirmado, assim como a ausência de benefício no crescimento associado à inoculação com *R. clarus* A5. Já no caso da variedade BRS Esmeralda observou-se indiferença à inoculação tanto com os isolados de DSE quanto com *R. clarus* A5.

A avaliação nutricional do tecido foliar indicou efeito significativo das variedades nos teores de nutrientes (Tabela 6). A parte aérea das plantas da variedade Arroz 70 apresentou menores teores de N e P, porém maiores teores de K, Ca e Mg que aquelas da variedade BRS Esmeralda. O teor de N nas plantas da variedade Arroz 70 foi menor no tratamento com adubação completa, havendo altíssima correção negativa ($r = -0,9996$; $p \leq 0,01$) do teor de N e a massa seca da parte aérea desta variedade, indicando efeito de diluição do nitrogênio nas plantas de maior crescimento. Isto sugere que as plantas da variedade Arroz 70, com crescimento superior ao da variedade BRS Esmeralda, demandam muito N, e mesmo a adubação completa deste nutriente não permitiu manter os teores foliares acima de 20 g kg^{-1} como verificado nos demais tratamentos. Assim, as plantas inoculadas com os isolados de *P. macrospinosa*, que apresentaram menor massa seca, tiveram maior teor de N que os demais tratamentos. Para a variedade BRS Esmeralda não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao teor de N. Em relação ao teor de P, a variedade Arroz 70 não apresentou diferença entre os tratamentos de inoculação. Porém, na variedade BRS Esmeralda a inoculação com *P. macrospinosa* A111 e A124, assim como o controle com adubação completa, apresentaram maior teor de P na parte aérea. Quanto ao teor de K, a variedade Arroz 70 apresentou menores teores nos controles A5 e A5+adubo, enquanto a variedade BRS Esmeralda não mostrou diferença entre os tratamentos de inoculação para os teores desse nutriente. Os teores de Ca e Mg apresentaram o mesmo comportamento, sendo que na variedade Arroz 70, foram mais baixos no tratamento inoculado com o isolado A113, enquanto na variedade BRS Esmeralda não houve efeito dos tratamentos de inoculação nesses nutrientes.

O principal benefício nutricional associou-se aos maiores teores foliares de P na variedade BRS Esmeralda derivado da inoculação com os isolados A111 e A124 de *P. macrospinosa*. Já na variedade Arroz 70, o isolado A113 de *P. macrospinosa* que teve efeito negativo sobre o crescimento das plantas, reduziu os teores de Ca e Mg, sugerindo uma relação dos teores de Ca e Mg com o menor crescimento neste tratamento. Por outro lado, excetuando o teor de K no Arroz 70, não houve diferenças nos demais nutrientes entre os tratamentos A5 e Ni, indicando também ausência de efeito nutricional da inoculação micorrízica com *R. clarus* A5 no arroz.

A colonização média pelos isolados de *P. macrospinosa* (DSE) e *R. clarus* A5 (FMA) nas plantas de arroz de ambas as variedades foi baixa (Tabela 7). A colonização por DSE não diferiu entre as variedades, mas a de FMA foi maior na variedade BRS Esmeralda. Foram observadas nas raízes estruturas melanizadas típicas de colonização por DSE como microescleródios e hifas septadas (Figura 17). Na variedade Arroz 70 não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos de inoculação na colonização tanto por DSE, quanto por FMA, visto que a colonização foi muito baixa. Já no caso da variedade BRS Esmeralda foi constatada maior colonização por *P. macrospinosa* nas plantas inoculadas com os isolados A111 e A113. Por outro lado, maiores valores de colonização por FMA foram associados à inoculação conjunta com o isolado A111 e na inoculação isolada de *R. clarus* A5, tanto com a adubação reduzida a 1/3 (A5) quanto com a adubação completa (A5+adubo).

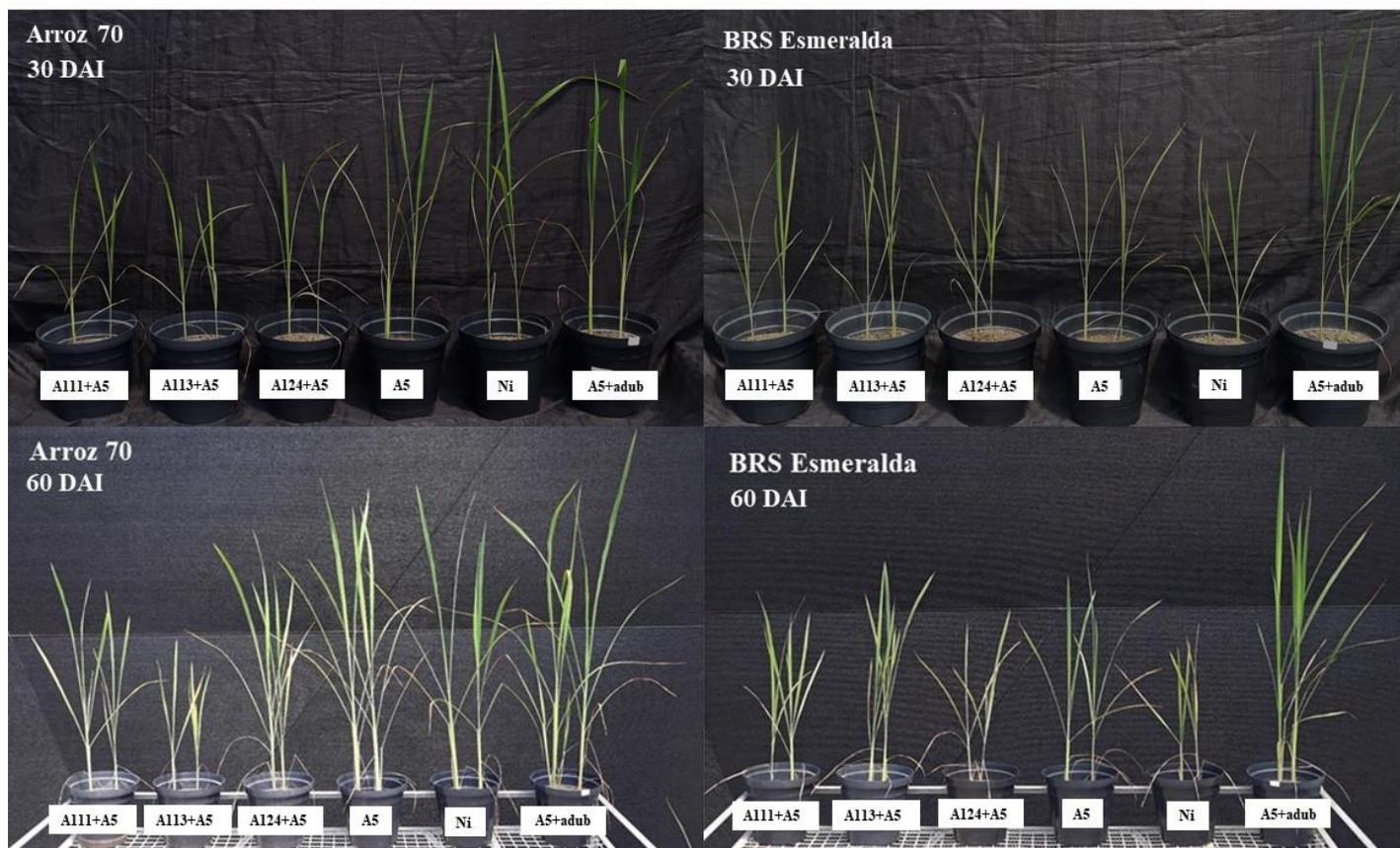


Figura 16. Plantas de arroz aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) com os isolados A111, A113 e A124 de *Periconia macrospinosa* e o fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5. A111+A5: inoculação de *P. macrospinosa* A111 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A113+A5: inoculação de *P. macrospinosa* A113 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A124+A5: inoculação de *P. macrospinosa* A124 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5: controle não inoculado com *P. macrospinosa* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação reduzida; Ni: controle não inoculado com ambos, *P. macrospinosa* e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5+adub: controle não inoculado com *P. macrospinosa* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação completa

Tabela 4. Altura da planta até a folha +1 (mm), largura e comprimento da folha +1 (mm), número de folhas e perfilhos de plantas de arroz das variedades BRS Esmeralda e Arroz 70 após 30 e 55 dias da inoculação com as linhagens A111, A113 e A124 do fungo endofítico septado escuro (DSE) *Periconia macrospinoso* e do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5.

Tratamentos	----- 30 dias após a inoculação -----				----- 55 dias após a inoculação -----				
	Altura	Folha+1		Número de folhas	Altura	Folha+1		Número de folhas	Número de perfilhos
		Largura	Comprimento			Largura	Comprimento		
Efeito do fator variedade de arroz									
BRS Esmeralda	121,8 b	5,72 b	279,6 b	3,17 b	169,4 b	7,95 b	36,09 b	2,85 b	0,08 a
Arroz 70	159,3 a	7,18 a	354,1 a	3,50 a	232,8 a	9,28 a	47,47 a	3,42 a	0,12 a
Desdobramento dos tratamentos de inoculação dentro do fator variedade									
Arroz 70									
A111+A5	142,5 b	6,60 b	319,0 b	3,60 a	210,5 b	8,30 b	43,91 b	3,20 b	0,00 a
A113+A5	108,8 c	5,70 b	290,0 b	2,90 b	180,8 b	8,30 b	39,66 b	3,60 b	0,00 a
A124+A5	141,9 b	6,70 b	316,6 b	3,40 a	196,2 b	8,20 b	39,89 b	3,00 b	0,00 a
A5	186,6 a	7,70 a	389,6 a	3,50 a	250,8 a	9,50 a	51,37 a	3,10 b	0,20 a
Ni	192,7 a	8,40 a	412,0 a	3,90 a	274,7 a	10,40 a	53,57 a	3,30 b	0,10 a
A5+adubo	183,2 a	8,00 a	397,5 a	3,70 a	283,8 a	11,00 a	56,40 a	4,30 a	0,40 a
BRS Esmeralda									
A111+A5	129,9 b	5,70 b	291,9 b	3,40 a	179,5 b	8,30 b	38,08 b	3,10 b	0,00 b
A113+A5	107,4 b	5,30 b	279,2 b	3,10 a	148,0 b	7,50 b	34,51 b	2,60 b	0,00 b
A124+A5	115,5 b	5,30 b	248,9 b	2,80 a	131,4 b	7,00 b	30,51 b	2,40 b	0,00 b
A5	109,1 b	5,10 b	244,6 b	2,90 a	143,3 b	6,70 b	31,72 b	2,70 b	0,00 b
Ni	113,4 b	5,70 b	269,6 b	3,30 a	153,2 b	7,30 b	33,20 b	2,40 b	0,00 b
A5+adubo	155,5 a	7,20 a	343,7 a	3,50 a	260,7 a	10,90 a	48,51 a	3,90 a	0,50 a

A111+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A111 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A113+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A113 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A124+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A124 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5: controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação reduzida; Ni: controle não inoculado com ambos, *P. macrospinoso* e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5+adubo: controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação completa. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças pelo Test de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Tabela 5. Peso fresco e seco da parte aérea (g), volume radicular (cm³) e peso seco das raízes (g) de plantas de arroz das variedades BRS Esmeralda e Arroz 70 após 60 dias da inoculação com as linhagens A111, A113 e A124 do fungo endofítico septado escuro *Periconia macrospinoso* e do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5.

Tratamentos	Peso fresco parte aérea	Peso seco parte aérea	Volume radicular	Peso seco radicular
Efeito do fator variedade de arroz				
BRS Esmeralda	5,72 b	1,38 b	59,7 b	0,69 b
Arroz 70	10,18 a	2,28 a	64,1 a	1,45 a
Desdobramento dos tratamentos de inoculação dentro do fator variedade				
Arroz 70				
A111+A5	6,69 c	1,50 c	59,0 c	0,84 c
A113+A5	5,80 c	1,30 c	58,0 c	0,55 c
A124+A5	7,44 c	1,66 c	61,2 c	0,87 c
A5	11,39 b	2,60 b	65,0 b	1,74 b
Ni	12,41 b	2,75 b	66,6 b	1,74 b
A5+adubo	17,35 a	3,87 a	74,8 a	2,93 a
BRS Esmeralda				
A111+A5	6,21 b	1,50 b	60,4 b	0,76 a
A113+A5	3,81 b	0,97 b	58,2 b	0,54 a
A124+A5	3,30 b	0,83 b	56,8 b	0,45 a
A5	4,03 b	0,97 b	58,0 b	0,55 a
Ni	3,82 b	0,97 b	57,8 b	0,48 a
A5+adubo	13,12 a	3,06 a	67,2 a	1,32 a

A111+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A111 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A113+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A113 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A124+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A124 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5: controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação reduzida; Ni: controle não inoculado com ambos, *P. macrospinoso* e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5+adubo: controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação completa. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças pelo Test de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Tabela 6. Teores folhares de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, e em plantas de arroz das variedades BRS Esmeralda e Arroz 70 após 60 dias da inoculação com as linhagens A111, A113 e A124 do fungo endofítico septado escuro (DSE) *Periconia macrospinoso* e do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5.

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg
	----- g kg ⁻¹ -----				
Efeito do fator variedade de arroz					
BRS Esmeralda	25,9 a	0,99 a	13,63 b	3,93 b	2,38 b
Arroz 70	23,0 b	0,75 b	15,66 a	4,45 a	3,07 a
Desdobramento dos tratamentos de inoculação dentro do fator variedade					
Arroz 70					
A111+A5	23,7 a	0,63 a	17,23 a	4,46 a	3,24 a
A113+A5	26,7 a	0,75 a	18,24 a	3,62 b	2,43 b
A124+A5	25,5 a	0,74 a	15,61 a	4,44 a	3,01 a
A5	21,8 b	0,86 a	13,03 b	5,08 a	3,20 a
Ni	21,9 b	0,68 a	15,92 a	4,51 a	3,13 a
A5+adubo	18,2 c	0,87 a	13,92 b	4,59 a	3,39 a
BRS Esmeralda					
A111+A5	26,8 a	1,27 a	12,19 a	3,96 a	2,48 a
A113+A5	26,8 a	0,65 b	12,88 a	3,97 a	2,16 a

A124+A5	27,0 a	1,23 a	13,54 a	3,60 a	2,64 a
A5	25,9 a	0,77 b	13,96 a	4,19 a	2,34 a
Ni	24,8 a	0,64 b	15,77 a	3,82 a	2,15 a
A5+adubo	24,0 a	1,41 a	13,42 a	4,07 a	2,51 a

A111+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A111 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A113+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A113 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A124+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A124 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5: controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação reduzida; Ni: controle não inoculado com ambos, *P. macrospinoso* e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5+adubo: controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação completa. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças pelo Test de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Colonização radicular de plantas de arroz das variedades BRS Esmeralda e Arroz 70 após 60 dias da inoculação com as linhagens A111, A113 e A124 do fungo endofítico septado escuro (DSE) *Periconia macrospinoso* e do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* A5 (FMA).

Tratamentos	Colonização por DSE (%)	Colonização por FMA (%)
Efeito do fator variedade de arroz		
BRS Esmeralda	1,4 a	11,6 a
Arroz 70	2,4 a	4,6 b
Desdobramento dos tratamentos de inoculação dentro do fator variedade		
Arroz 70		
A111+A5	1,4 a	2,8 a
A113+A5	4,0 a	6,8 a
A124+A5	3,0 a	4,6 a
A5	0,0 a	8,0 a
Ni	0,0 a	0,0 a
A5+adubo	0,0 a	5,6 a
BRS Esmeralda		
A111+A5	4,0 a	18,2 a
A113+A5	7,8 a	8,8 b
A124+A5	2,4 b	5,8 b
A5	0,0 b	13,8 a
Ni	0,0 b	0,0 b
A5+adubo	0,0 b	23,2 a

A111+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A111 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A113+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A113 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A124+A5: inoculação de *P. macrospinoso* A124 e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5: controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação reduzida; Ni: controle não inoculado com ambos, *P. macrospinoso* e *R. clarus* A5, com adubação reduzida; A5+adubo: controle não inoculado com *P. macrospinoso* e inoculado com *R. clarus* A5, com adubação completa. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças pelo Test de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

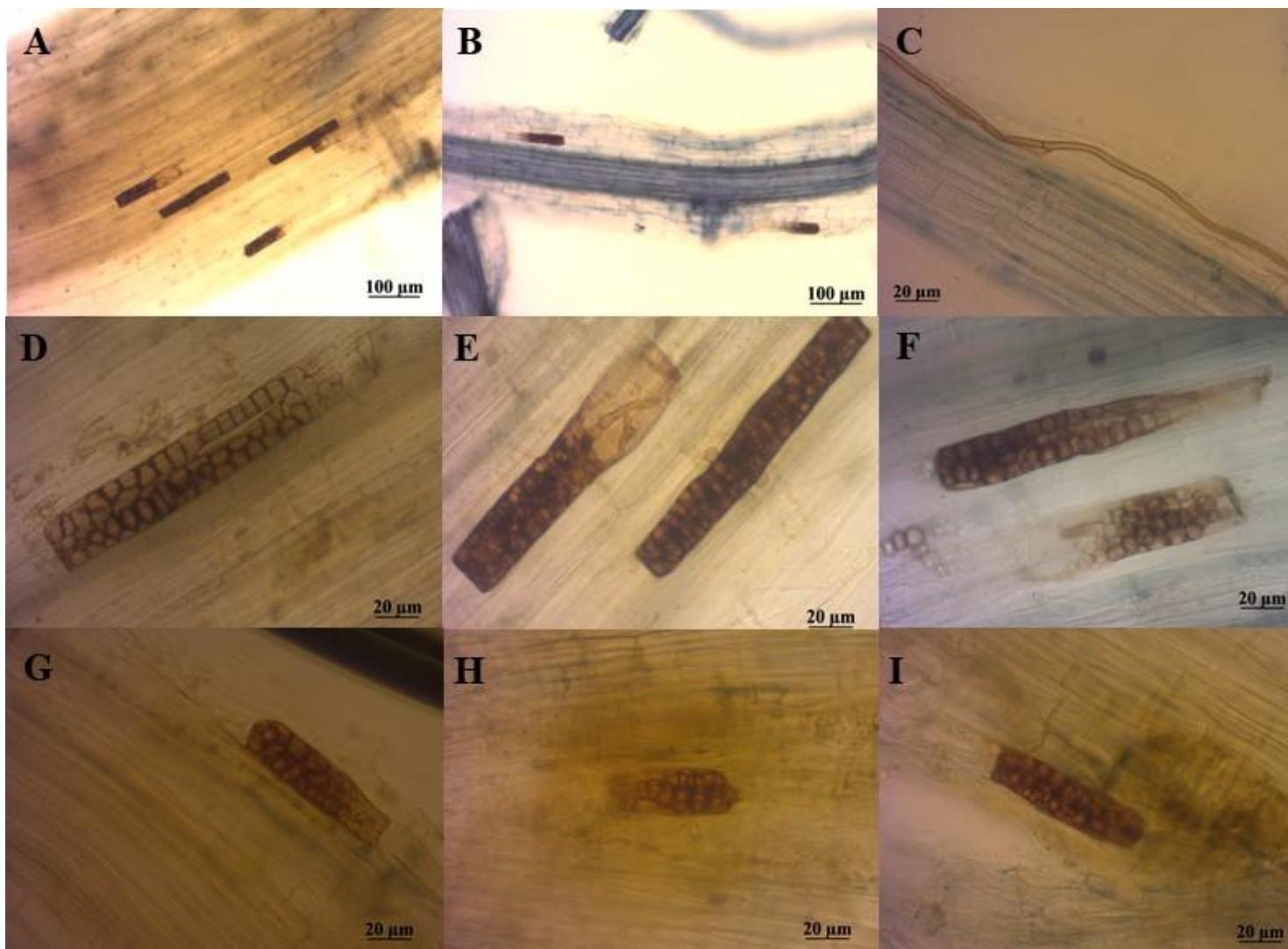


Figura 17. Microescleródios (A,B, D-I) e hifas septadas (C) em plantas de arroz 60 dias após inoculação com isolados do fungo endofítico septado escuro *Periconia macrospinoso*.

3.5.3 Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco *in vitro* por isolados de endófitos septados escuros

Nenhum dos isolados avaliados solubilizou $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ *in vitro*. Porém, oito deles (A112; A115; A120; A121; A123; A124; A125 e A126) solubilizaram ZnO. A eficiência relativa de solubilização de óxido de Zn pelas colônias de DSE é apresentada na figura 18. Os isolados A120 (*Pleosporales* sp.) e A124 (*P. macrospinosa*) apresentaram as maiores eficiências relativas de solubilização de ZnO, correspondente a 550% e 365%, respectivamente. Outros isolados de *P. macrospinosa* (A115, A125 e A126) e de *Pleosporales* sp. (A121 e A123) mostraram menor eficiência de solubilizar ZnO, porém o halo de solubilização ainda era destacado. O isolado A112, identificado como *Curvularia* sp., também apresentou halo de solubilização de ZnO *in vitro*.

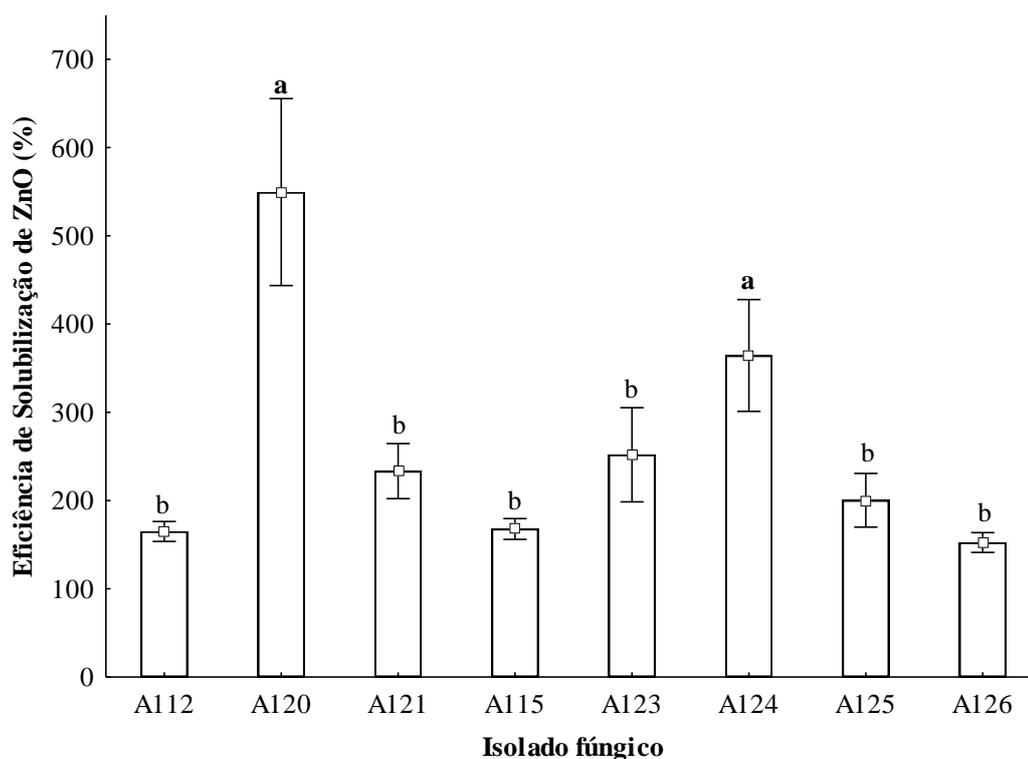


Figura 18. Valores médios (\pm erro padrão) da eficiência relativa de solubilização de óxido de zinco em meio de cultura sólido pelas colônias de diferentes isolados de fungos endofíticos septados escuros isolados de raízes de plantas de cana-de-açúcar da região produtora de Quatá, São Paulo, Brasil. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Desta maneira, entre os 15 isolados testados, aqueles pertencentes à ordem Pleosporales se destacaram pela capacidade de solubilização de ZnO *in vitro*. Apenas alguns isolados dessa ordem pertencentes à família Lentitheciaceae (A119 e A122) não solubilizaram ZnO. Por outro lado, alguns isolados de *P. macrospinosa*, como o A111 e o A113, não formaram halo em torno das colônias, indicando incapacidade de solubilização de ZnO nas condições testadas, sugerindo assim diferenças entre isolados de uma mesma espécie no referente à capacidade de solubilização. Também não houve solubilização por isolados de outras ordens, como *P. bamuru* (A118) e *Nigrospora* sp. (A114 e A116).

3.6 DISCUSSÃO

3.6.1 Inoculação *in vitro* de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar com isolados de endófitos septados escuros

No presente trabalho verificou-se grande variação, de positiva a negativa, na resposta à inoculação de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar com diferentes isolados de fungos DSE previamente isolados da própria cultura. A maioria dos fungos endofíticos escuros isolados das raízes da cana tiveram uma relação parasítica com a cultura quando inoculados *in vitro*. Sessenta por cento dos isolados testados diminuíram a produção da biomassa aérea das mudas inoculadas em relação ao controle não inoculado. Isto confirma resultados prévios que sugerem que sob condições naturais, a cana-de-açúcar abriga maior variedade de fungos neutros ou antagonistas do que mutualistas (Kageyama et al., 2008). Uma meta-análise recente incluindo estudos publicados sobre o efeito de fungos endofíticos radiculares sugere que haja efeito positivo da inoculação na mesma espécie vegetal a partir da qual foram isolados, e efeito negativo quando inoculado em outras plantas (Mayerhofer et al., 2013). Porém, de acordo com resultados obtidos por Mandyam et al. (2012) o fato de uma planta estar colonizada por DSE no seu ambiente natural, não indica precisamente resposta positiva à re-inoculação pelos fungos deste grupo isolados do respectivo hospedeiro vegetal. Paralelamente, é possível que uma espécie de DSE colonize e favoreça a uma espécie vegetal diferente daquela a partir da qual foi isolada. Nesse sentido, Vergara et al. (2017) documentaram resposta positiva de plantas de tomate à inoculação com fungos DSE previamente isolados de arroz selvagem.

Embora o número de pesquisas envolvendo DSE tenha aumentado notavelmente nas últimas duas décadas (Berthelot et al., 2019), é ainda muito difícil afirmar o caráter benéfico da simbiose para o hospedeiro vegetal. Mayerhofer et al. (2013) sugerem efeito negativo a neutro associado à colonização por endófitos radiculares, incluindo DSE. Por outro lado, de acordo com Newsham (2011), a simbiose entre plantas e DSE é predominantemente positiva. Ao mesmo tempo resultados mais recentes sugerem que a associação oscila no contínuo mutualismo-parasitismo (Mandyam & Jumpponen, 2015), podendo os resultados e conclusões variar em função da espécie de hospedeiro vegetal, espécie ou linhagem de endófito, genótipo de ambos os simbiossomas, nível de colonização e condições experimentais (Mandyam et al., 2012). De acordo com Berthelot et al. (2019) generalizações envolvendo a natureza ou função dos DSE são, no mínimo, problemáticas se considerada a ampla diversidade taxonômica do grupo e o ainda limitado número de estudos.

Isolados dos gêneros *Curvularia* (A112), *Nigrospora* (A114, A116), *Phialocephala* (A118) e outros pertencentes à ordem Pleosporales (A119, A122, A120, A121 e A123) mostraram efeito negativo sobre a produção de biomassa da cana-de-açúcar. Particularmente, a inoculação com *Curvularia* sp. (A112) foi responsável pelas maiores perdas de biomassa aérea e a maior mortalidade das plantas inoculadas. Esse gênero inclui diversos patógenos causadores de grandes prejuízos econômicos na esfera agrícola (Gao et al., 2014; Liang et al., 2018). Porém, é também comum a sua ocorrência como endófito radicular (Bonfim et al., 2016; Rothen et al., 2017). Alguns estudos destacam, inclusive, a importância biotecnológica das espécies do gênero na promoção do crescimento vegetal a partir da solubilização de fosfatos e produção de fitohormônios como ácido indol acético (Priyadharsini & Muthukumar, 2017). O fungo A112 foi isolado de tecidos sadios de raízes de cana, o qual lhe confere caráter endofítico. Porém, a resposta das plantas à simbiose com os DSE é altamente dependente do contexto (Newsham, 2011; Mayerhofer et al., 2013; Mandyam & Jumpponen, 2015), e a possibilidade de uma resposta positiva à inoculação com *Curvularia* sp. A112, em plantas de cana sob condições diferentes das aqui testadas, não deve ser descartada. Por outro lado, alguns conceitos de endófito compreendem a ocorrência de patógenos latentes (Hardoim et al., 2015). Assim, as

afirmações acima podem ser consideradas válidas também para aqueles outros isolados que inibiram o crescimento das plântulas de cana *in vitro*.

Por outro lado, houve consistência na resposta positiva das plântulas inoculadas com diferentes linhagens de *Periconia macrospinosa*. Mesmo na ausência de diferença estatística na produção de massa seca em relação ao controle não inoculado, é válido destacar que os isolados desta espécie estimularam a produção de biomassa aérea das plantas de cana quando comparada ao controle não inoculado. Considerando que *P. macrospinosa* não inibiu o desenvolvimento das plantas, é possível que em campo a espécie atue na promoção do crescimento vegetal de cana através de outros mecanismos como mineralização e absorção de nutrientes ou aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos. Estudos prévios destacam a capacidade de fungos do tipo DSE em favorecer os seus hospedeiros vegetais por meio desses mecanismos (Newsham, 2011; Santos et al., 2017; Vergara et al., 2017; Vergara et al., 2018; Berthelot et al., 2019). Adicionalmente, a complexidade e hiperdiversidade do ambiente edáfico não deve ser ignorada, e possíveis interações sinérgicas entre *P. macrospinosa* e outros microrganismos endófitos ou rizosféricos não devem ser descartadas (Mandyam & Jumpponen, 2014).

Mandyam et al. (2013) testaram o efeito da inoculação com 34 linhagens de *P. macrospinosa* em três acessos de *Arabidopsis thaliana*. Os autores verificaram efeito do genótipo de ambos os simbiontes na resposta das plantas à inoculação. O número de isolados com efeito neutro nas plantas oscilou entre 12 e 21 em função do acesso de *A. thaliana*, enquanto houve efeito negativo da inoculação com dois a 13 isolados. Já o número de isolados que estimulou a produção de biomassa variou de zero a seis. No geral, os resultados do supracitado estudo sugerem predominância de uma resposta neutra a negativa derivada da simbiose entre plantas e o DSE *P. macrospinosa*. Já no presente trabalho, a inoculação com vários isolados da espécie mostrou-se neutra em relação à produção de biomassa aérea das plantas de cana quando comparada ao controle não inoculado.

Existem poucas pesquisas abordando não apenas a ocorrência, mas principalmente as funções dos fungos DSE na cana-de-açúcar e em outras culturas. Nesse sentido, Ling et al. (2013) avaliaram o efeito de seis fungos DSE na altura e peso seco de plântulas de cana. Verificaram resultados variáveis em função do isolado fúngico, reportando valores significativamente superiores em plantas inoculadas com *Meliniomyces variabilis* em comparação ao controle não inoculado. Porém, não existem estudos abordando a ocorrência ou efeito da colonização por *P. macrospinosa* em plantas de cana-de-açúcar. Requerem-se, assim, pesquisas posteriores que abordem o efeito de diferentes linhagens deste fungo em mais de uma variedade de cana e diferentes condições de crescimento da cultura para obter maior conhecimento sobre esta simbiose e sua aplicação potencial na produção canavieira.

Periconia macrospinosa tem sido principalmente reportada associada às raízes de gramíneas, se destacando entre os fungos mais comumente isolados de plantas de pastagens e pradarias em várias regiões do mundo (Mandyam et al., 2010; Grünig et al., 2011; Knapp et al., 2012). Resultados de campo e laboratório obtidos por Mandyam et al. (2012) sugerem maior compatibilidade entre gramíneas e DSE, do que entre outras plantas herbáceas (*forbs*, em inglês) e este grupo de fungos. De igual forma, os autores destacam maior resposta de gramíneas à inoculação com *P. macrospinosa*. Isto pode ser considerado um indicador da possível importância funcional da simbiose entre gramíneas e *P. macrospinosa*, assim como do potencial uso biotecnológico desta espécie em culturas graminóides de interesse agrícola como a cana-de-açúcar.

Como referido nos resultados, os isolados de *P. macrospinosa* e o isolado de *Nigrospora* sp. (A116) aumentaram o acúmulo de P na parte aérea das plantas de cana. Estudos prévios confirmam a capacidade de fungos deste grupo em melhorar a nutrição fosfatada de plantas inoculadas (Newsham, 2011; Vergara et al., 2018; Yakti et al., 2018). Entretanto, esses estudos relatam que alguns dos fungos associados com maiores teores de P nas plantas, não

colonizaram de forma consistente ou abundante as raízes. Outros mostraram colonização densa, porém diminuíram os teores deste nutriente nos tecidos. Desta forma, não há relatos de uma correlação entre o acúmulo de nutrientes no tecido aéreo de plantas e a intensidade de colonização por DSE (Berthelot et al., 2017; Berthelot et al., 2019). No presente estudo, embora a colonização dos isolados de *P. macrospinosa* e *Nigropora* sp. tenham se destacado quanto a presença de estruturas fúngicas, também não foi possível verificar essa possibilidade de relação com a nutrição fosfatada.

3.6.2 Inoculação de duas variedades de arroz com três isolados de *Periconia macrospinosa* e um isolado de *Rhizophagus clarus*

Foi confirmada a capacidade de isolados de *P. macrospinosa* de colonizarem não apenas plantas de cana-de-açúcar (planta de origem), mas também de arroz, corroborado a variação de hospedeiros vegetais das espécies de DSE e sua ausência de especificidade (Jumpponen & Trappe, 1998). Diversos trabalhos relatam a ocorrência da simbiose entre fungos do tipo DSE e arroz. Ribeiro et al. (2011) inocularam *in vitro* plantas de *Oryza sativa* e *Oryza glumaepatula* com cinco fungos DSE previamente isolados de arroz selvagem (*Oryza glumaepatula*). Os autores verificaram capacidade de colonização do córtex radicular por parte dos isolados e o crescimento de plantas saudáveis mesmo na presença dos fungos. Mais recentemente, Santos et al. (2017) constataram a capacidade de quatro isolados de fungos DSE das ordens Calosphaerales, Capnodiales e Pleosporales em aumentar, *in vitro*, a tolerância de plantas de arroz a estresses salino e hídrico. Outro estudo recente aponta para o efeito de isolados de DSE em promover o crescimento de plantas de arroz, particularmente a partir do aumento na absorção de nutrientes, em especial N e P (Vergara et al., 2018). Todos esses estudos sugerem, no geral, efeito positivo da simbiose entre espécies de DSE e plantas de arroz, ao mesmo tempo que destacam a variedade de mecanismos através dos quais estes fungos podem estimular o crescimento de plantas da cultura. Porém, não foram encontrados registros da ocorrência de colonização de *P. macrospinosa* como endófito radicular do arroz, podendo o presente trabalho ser o primeiro relato.

A simbiose entre *P. macrospinosa* e *O. sativa* mostrou-se dependente do genótipo de ambos os simbiotes, com ênfase no efeito da variedade de arroz. A variedade crioula Arroz 70 teve seu crescimento prejudicado pela simbiose com *P. macrospinosa*, enquanto a variedade melhorada BRS Esmeralda teve resposta neutra no seu crescimento com essa simbiose. Como é bem documentado, variações genotípicas dentro da mesma espécie vegetal, incluindo variedades botânicas e cultivares agrônomicas, induzem alterações nas comunidades endofíticas (Bazghaleh et al., 2015; Baum et al., 2018; Bazghaleh et al., 2018; Dong et al., 2018). Bazghaleh et al. (2015) avaliaram a diversidade de endófitos fúngicos radiculares em 13 cultivares de grão-de-bico plantadas em um mesmo solo durante dois anos consecutivos. Os autores verificaram efeito do cultivar sobre a riqueza e diversidade das comunidades de endófitos fúngicos radiculares, o qual foi consistente entre os anos de estudo. Segundo Bazghaleh et al. (2018) programas de melhoramento vegetal visando aumentar a produtividade e resistência a pragas e doenças podem selecionar genótipos com pouca resposta a simbioses fúngicas. Como consequência, possíveis variações nas comunidades endofíticas associadas a diferentes cultivares não podem ser detectadas ou a resposta de diferentes isolados também pode ser minimizada. Sugere-se que estes comportamentos estejam associados às variações na composição dos exsudatos radiculares entre outras diferenças de compatibilidade bioquímica que os genótipos promovem (Hardoim et al., 2015). Desta forma, diferenças relativas ao genótipo de cada cultivar ou variedade também podem induzir respostas diferentes derivadas da simbiose com um mesmo isolado fúngico. Isto é confirmado pelos resultados obtidos por Mandyam et al. (2013) ao testarem o efeito de 34 isolados de *P. macrospinosa* e quatro isolados

de *Microdochium* sp. no crescimento de três acessos de *Arabidopsis thaliana*. De acordo com os autores, os isolados de ambas as espécies de DSE raramente tiveram efeitos consistentes entre os três acessos de *A. thaliana* inoculados.

Estudos anteriores sugerem que fungos DSE estimulam a absorção de N e o crescimento das plantas com as quais se associam principalmente na presença ou aplicação de fontes orgânicas de N (Newsham, 2011; Vergara et al., 2018). Porém, no presente trabalho não foi possível observar se houve benefício com fonte inorgânica, devido a um claro efeito de diluição (Imo, 2012) do N nas plantas de maior crescimento da variedade Arroz 70. Assim, o efeito da inoculação com *P. macrospinosa* no teor de N observado na variedade Arroz 70 reflete em parte um possível efeito deste fungo em melhorar a nutrição nitrogenada e, por outra parte, o menor crescimento destas plantas em uma condição de N limitante para essa variedade de arroz de maior e mais rápido crescimento que a BRS Esmeralda. O aumento no teor de N em plantas inoculadas com DSE pode também ser observado quando esse nutriente é fornecido em formas inorgânicas, conforme reportado por Vergara et al. (2018), onde um isolado de DSE aumentou o teor de N em plantas de arroz em até 30% após a aplicação de nitrato de amônio. De acordo com resultados obtidos por Yakti et al. (2018) isolados de *P. macrospinosa* e *Cadophora* sp. são capazes de utilizar fontes tanto orgânicas quanto inorgânicas de P e N *in vitro*, ao tempo que fontes orgânicas destes elementos não garantem promoção do crescimento das plantas.

Ao contrário do que se acredita sobre o efeito dos DSE na nutrição nitrogenada, o aumento no teor de P na parte aérea de plantas inoculadas com DSE é geralmente associada à aplicação de P inorgânico (Newsham, 2011; Vergara et al., 2018). Os resultados aqui obtidos apontam a capacidade de *P. macrospinosa* de aumentar o teor foliar de P em plantas da variedade BRS Esmeralda, as quais foram suplementadas com fosfato de potássio. Porém, ainda é difícil generalizar o benefício nutricional dos DSE na absorção de P, pois na variedade Arroz 70 não se observou efeito. Ao mesmo tempo, a inoculação com DSE na presença de fontes inorgânicas de P tem sido igualmente associada a menores teores desse nutriente no tecido aéreo das plantas (Yakti et al., 2018).

O menor crescimento das plantas da variedade Arroz 70 inoculadas com o isolado A113, evidenciado precocemente na altura aos 30 dias da inoculação, nutricionalmente parece estar associado à diminuição nos teores de Ca e Mg na parte aérea. Mais uma vez os resultados referentes a pesquisas anteriores mostram-se contraditórios e impossibilitam delimitar um padrão geral sobre o efeito dos DSE na nutrição do hospedeiro vegetal. O teor de Ca em plântulas de *Ammopiptanthus mongolicus* foi estimulado pela inoculação com *Phialophora* sp., porém diminui em relação ao tratamento controle quando isolados de *Paraconiothyrium* sp. e *Darksidea* sp. foram inoculados (Li et al., 2018). Em plantas de tomateiro inoculadas com três isolados de DSE, aumentos nos teores de Ca e Mg foram relacionados apenas à aplicação de fontes orgânicas de N, não sendo evidenciados quando aplicado o N na forma inorgânica (Vergara et al., 2017). Em outro estudo foi verificado efeito neutro da inoculação com quatro isolados de DSE sobre os teores de Ca no tecido aéreo de plantas de arroz; ao tempo que constataram aumento, diminuição e efeito neutro da inoculação com os diferentes isolados na concentração de Mg das plantas (Vergara et al., 2018).

A colonização radicular pelos isolados de *P. macrospinosa* e por *R. clarus* A5 nas plantas de arroz de ambas as variedades foi baixa. O anterior pode ser o resultado da falta de adaptação entre os hospedeiros e os isolados de fungos simbiotes, ou ainda falta de adaptação dos isolados às condições edafo-ambientais do experimento. Como já mencionado, o efeito da inoculação com DSE é variável em função dos genótipos de ambos os simbiotes, assim como do ambiente (Newsham, 2011; Mayerhofer et al., 2013; Mandyam & Jumpponen, 2015). Já a simbiose micorrízica arbuscular, embora não seja considerada específica apresenta níveis de preferência entre os hospedeiros vegetais e as espécies de FMAs (Van Geel et al., 2016).

A pouca resposta à inoculação obtida neste experimento poderia ser fruto desta baixa colonização se considerado *R. clarus* A5, porém resultados previamente documentados sugerem que este poderia não ser o caso para os DSE. Yakti et al. (2018) também observaram baixos níveis ou até ausência de colonização em plantas de tomate inoculadas com *P. macrospinosa*, mesmo quando a sua presença estimulou o crescimento e nutrição das plantas. Por meio de métodos moleculares, os autores confirmaram a presença de *P. macrospinosa* no solo onde as plantas foram inoculadas. Esses autores afirmam a possibilidade de que alguns DSE promovam o crescimento vegetal sem que seja estritamente necessário colonizar as plantas com as quais interagem. Algumas vias através das quais isso poderia acontecer compreendem a liberação de compostos voláteis, mineralização de matéria orgânica, solubilização de fosfatos, secreção de enzimas que atuam sobre a degradação de carboidratos complexos, produção de substâncias antimicrobianas e resistência sistêmica induzida, todos eles já confirmados para algumas espécies de DSE (Spagnoletti et al., 2017; Knapp et al., 2018; Berthelot et al., 2019). A ausência de uma ampla interface entre o fungo e a planta e de estruturas próprias para a troca de nutrientes reafirmam a possibilidade de os DSE atuarem pelos mecanismos supracitados (Berthelot et al., 2019), havendo a necessidade dos isolados do presente trabalho serem avaliados quanto a isso. Porém, o contrário também tem sido observado. Vergara et al. (2018) reportaram diminuição na altura de plantas de arroz inoculadas com um isolado de DSE cuja colonização média foi de 63,6%, valor que pode ser considerado elevado.

No caso dos FMAs, maior eficiência ou resposta das plantas à simbiose micorrízica arbuscular é geralmente associada a aumentos na colonização radicular (Moreira et al., 2019; Chenchouni et al., 2020). Particularmente a disponibilidade de P no solo pode ter influenciado diretamente a colonização micorrízica, resultando na inexistência de resposta das plantas de arroz à inoculação com *R. clarus* A5. Independentemente da textura do solo, teores de P inferiores a 5 mg L⁻¹ são considerados baixos para a cultura de arroz em sequeiro (Veloso et al., 2009). Níveis extremos deste nutriente no solo, sejam estes muito baixos ou muito altos, têm sido reportados entre as principais formas de inibição da simbiose micorrízica (Cardoso et al., 2017). Desta forma, é possível, que a adubação reduzida aplicada no experimento não tenha suprido a demanda de P das plantas de arroz, afetado assim a simbiose com *R. clarus* A5.

Na variedade BRS Esmeralda observou-se inibição da colonização de *R. clarus* A5 na presença dos isolados A113 e A124 de *P. macrospinosa*, entretanto, a colonização por *R. clarus* A5 não foi muito superior nos controles sem DSE, indicando que se houve inibição entre os simbiontes, essa inibição foi de pequena magnitude. De acordo com Scervino et al. (2009), quando co-inoculados *in vitro* o FMA *Gigaspora rosea* e o DSE *Dreschlera* sp., a concentração dos exsudatos deste último determina o crescimento hifal de *G. rosea*, podendo estimulá-lo ou inibi-lo. Já em campo, a avaliação da colonização radicular por parte de ambos os simbiontes fúngicos tem mostrado correlação tanto positiva (Lugo et al., 2009) quanto negativa (Bueno de Mesquita et al., 2018), indicando ausência de um padrão consistente quanto à ocupação radicular por parte destes fungos e a interação entre eles. Por outro lado, sinergismo na nutrição fosfatada de *Trifolium repens* tem sido sugerido por Della Monica et al. (2015) ao confirmarem função solubilizadora/mineralizadora de fosfatos pelos DSE seguido de aumento na absorção do P pelas plantas através da simbiose micorrízica. Porém, no geral os resultados mostram-se inconclusivos, sendo apenas estudos pontuais, de modo que pesquisas futuras que explorem os fatores determinantes e a função da tripla interação entre plantas, FMAs e DSE são ainda necessários para um melhor entendimento do assunto.

3.6.3 Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco *in vitro* por isolados de endófitos septados escuros

Como visto nos resultados, os isolados não solubilizaram fosfato de cálcio, mas 53% dos isolados de DSE testados mostraram capacidade de solubilizar óxido de zinco *in vitro*. O Zn é considerado um micronutriente essencial para as plantas, atuando como cofator enzimático de desidrogenases e nos processos de síntese e conservação de fitohormônios, como as auxinas. Este nutriente é também importante na formação de sementes, produção de clorofila e no metabolismo do nitrogênio (Dechen et al., 2018). A solubilização de Zn é comumente estudada em bactérias (Goteti et al., 2013; Costerousse et al., 2018; Khangahi et al., 2018), porém não é muito estudada entre os fungos, sendo ainda menos documentada para os DSE (Berthelot et al., 2019). A solubilização de Zn por fungos tem sido confirmada em espécies de *Aspergillus* e *Trichoderma*, sendo seu uso potencial não apenas agrícola, mas também na biorremediação de áreas contaminadas com este metal (Anuradha & Syed, 2016; Sutjaritvorakul et al., 2017).

A incapacidade observada dos isolados testados em solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ *in vitro* indicam que eles têm baixa capacidade de acidificação do meio. Além disso, os solos brasileiros apresentam, no geral, elevado grau de intemperismo associado a baixo pH e cálcio trocável, associado à predominância de óxidos de ferro e alumínio (Sousa et al., 2007; Cardoso et al., 2017). Consequentemente, estes fungos podem não ser adaptados a solubilizar fosfato de cálcio. Em solos ácidos há predominância da formação de fosfatos de ferro e alumínio, existindo a possibilidade dos isolados testados apresentarem maior capacidade de solubilizar essas fontes de fosfato que são mais comuns em solos brasileiros. De acordo com estudos prévios, isolados solubilizadores de fosfato de cálcio podem não solubilizar fosfato de ferro, e apenas alguns destes solubilizar fosfato de alumínio como verificado por Spagnoletti et al., (2017). Sendo assim, espera-se que o inverso também possa acontecer. Nesse sentido, Priyadharsini e Muthukumar (2017) verificaram maior capacidade solubilizadora de FePO_4 e AlPO_4 e menor solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ *in vitro* por parte do fungo DSE *Curvularia geniculata*. Portanto, sugere-se no futuro a repetição do ensaio usando FePO_4 e AlPO_4 , o que poderia confirmar esta hipótese.

3.7 CONCLUSÕES

A maioria dos isolados fúngicos escuros obtidos endofiticamente de raízes cana-de-açúcar promove decréscimo do crescimento da cana IAC 5000, confirmando que a inoculação de um DSE na mesma espécie vegetal da qual foi isolado não é garantia de promoção do crescimento.

Isolados de *Periconia macrospinosa* estimulam o crescimento de cana-de-açúcar IAC 5000, porém inibem o crescimento do arroz crioulo da variedade Arroz 70 e têm efeito neutro no crescimento do arroz melhorado BRS Esmeralda, indicando que fatores referentes aos genótipos dos simbiontes e da condição ambiental determinam a resposta da planta à inoculação com fungos DSE.

A inoculação com isolados de *Periconia macrospinosa* tende a aumentar a absorção de fósforo na cana IAC 5000 e no arroz BRS Esmeralda, o que juntamente com a capacidade de solubilizar óxido de zinco, os coloca como potenciais promotores da nutrição vegetal.

4 CAPÍTULO III

COMUNIDADES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS RADICULARES ASSOCIADOS À VARIEDADE RB966928 DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO

Diante da necessidade de aumentar a sustentabilidade da cana-de-açúcar, o isolamento e detecção de microrganismos promotores do crescimento vegetal é um campo de estudo em aberto. O estado líder da produção nacional e a variedade mais plantada neste estado foram os focos deste trabalho que teve como objetivo caracterizar, por métodos dependentes de cultura, a comunidade de fungos endofíticos radiculares (FER) associados à variedade RB966928 cultivada em São Paulo, Brasil e verificar a possível relação entre a composição de espécies e as características químicas do solo rizosférico. Adicionalmente, objetivou-se o depósito dos fungos isolados em coleção de culturas vivas estabelecendo assim as bases para estudos futuros envolvendo a prospecção biotecnológica destes fungos. Amostraram-se plantas e solo rizosférico em 24 pontos, distribuídos em 16 municípios e nove mesoregiões do estado. O isolamento de fungos endofíticos em meio de cultura a partir de raízes superficialmente desinfetadas permitiu a obtenção de 391 isolados, mantidos em culturas vivas, dos quais 320 tiveram a sua região ITS sequenciada com sucesso, se diferenciando em pelo menos 49 espécies. Aproximadamente, 85% dos fungos sequenciados (273 isolados) e 42 das espécies foram identificadas como pertencentes ao filo Ascomycota; enquanto o filo Basidiomycota esteve representado por 15% dos isolados (47 isolados) e sete espécies. *Periconia macrospinoso* (Pleosporales) e *Fusarium* sp. 3 (Hypocreales), do filo Ascomycota, foram as espécies mais abundantes e frequentemente isoladas. Foi verificada a presença muito comum do fungo potencialmente patogênico *Fusarium acutatum* e do fungo com potencial de controle biológico *Trichoderma harzianum*. Dentre os basidiomicetos, *Resinicium saccharicola* (Hymenochaetales) foi o fungo mais bem representado. As características químicas da rizosfera não se relacionaram à ocorrência dos diferentes táxons de FER associados à variedade de cana em estudo. Concluiu-se que a variedade de cana-de-açúcar RB966928 apresenta uma comunidade de FER de elevada riqueza de espécies, integrada principalmente por ascomicetos e dominada pelos gêneros *Fusarium* e *Periconia*, não sendo influenciada pelas características químicas do solo. A preservação de material genético vivo referente aos 391 isolados de fungos endofíticos radiculares de cana-de-açúcar representa um ponto de partida para estudos futuros de prospecção do potencial biotecnológico e capacidade promotora do crescimento vegetal.

Palavras-chave: *Saccharum* sp., simbiose, Ascomycota, Basidiomycota, diversidade, Fungi

4.2 ABSTRACT

Given the necessity to increase the sustainability of the sugarcane crop, the isolation and detection of plant growth promoting microorganisms is an open field of study. The leading State of the national production and the most planted variety were the focus of this work, which aimed to characterize, by culture-dependent methods, the community of root endophytic fungi (REF) associated with the variety RB966928 cultivated in São Paulo, Brazil and to study the relationship between the species composition and the chemical characteristics of the rhizosphere. Additionally, another objective of this work was to deposit the isolated fungi in a collection of live cultures, in order to establish the basis for future studies involving the biotechnological prospection of these fungi. Plants and rhizospheric soil were collected at 24 sampling points, distributed in 16 municipalities and nine mesoregions of the state. The isolation of endophytic fungi in culture medium from superficially disinfected roots allowed to obtain 391 isolates, of which 320 had their ITS region successfully sequenced, differentiating in at least 49 taxonomic groups. Approximately 85% of the sequenced fungi (273 isolates) and 42 of the verified taxonomic groups were identified as belonging to the phylum Ascomycota, while the phylum Basidiomycota was represented by 15% of the isolates (47 isolates) and seven taxonomic groups. *Periconia macrospinoso* (Pleosporales) and *Fusarium* sp. 3 (Hypocreales), from the phylum Ascomycota, were the most abundant and frequently isolated species. The potentially pathogenic fungus *Fusarium acutatum* and *Trichoderma harzianum*, a fungus with biological control potential, were very common. Among the basidiomycetes, *Resinicium saccharicola* (Hymenochaetales) was the best represented fungus. The chemical characteristics of the rhizosphere were not related to the occurrence of the different REF associated with the sugarcane variety under study. It was concluded that the sugarcane variety RB966928 presents a community of REF with high species richness, mainly composed by ascomycetes and dominated by the genera *Fusarium* and *Periconia*, not being influenced by the chemical characteristics of the soil. The preservation of live genetic material referring to the 391 isolates of sugarcane REF represents the starting point for future studies prospecting the biotechnological potential and plant growth promotion capacity of these fungi.

Key words: *Saccharum* sp., symbiosis, Ascomycota, Basidiomycota, diversity, Fungi.

4.3 INTRODUÇÃO

O último século foi marcado pelo desenvolvimento de pesquisas que conciliaram evidências sobre a importância da interação planta – microrganismo para a biologia, ecologia e evolução do hospedeiro vegetal (Berg et al., 2016; Simon et al., 2019). Surgiu nesse contexto o termo holobionte vegetal para definir uma espécie de “metaorganismo” composto pela associação evolutiva e indissolúvel naturalmente estabelecida entre as plantas e a vasta gama de microrganismos, ou microbiota, que a elas se associa (Berg et al., 2016; Sánchez-Cañizares, 2017). Pode-se afirmar que todos os órgãos vegetais servem de habitat para os microrganismos, desde a rizosfera/filosfera, que superficialmente acolhem os denominados epífitos, até a endosfera de sementes, frutos, folhas, caules ou raízes ocupada por microrganismos endofíticos (Turner et al., 2013; Tadych & White, 2019).

Particularmente, o termo endófito representa ainda um conceito em evolução. Originalmente, reconhecia-se como tal qualquer microrganismo capaz de ocupar o interior de tecidos vegetais sem causar danos aparentes à planta (Tadych & White, 2019). Porém, a principal deficiência vinculada ao referido conceito se encontra no caráter circunstancial da associação entre as plantas e a sua microbiota endofítica. Nesse sentido, destaca-se a ocorrência de patógenos latentes fazendo parte da comunidade de endófitos, assim como a transição de alguns destes organismos no contínuo mutualismo-parasitismo, dependendo não apenas de fatores genéticos e ambientais, mas também do estágio de desenvolvimento e estado nutricional de ambos os integrantes da simbiose (Schulz & Boyle, 2006; Mandyam & Jumpponen, 2015). Alguns autores sugerem, assim, que o termo endófito refere-se apenas ao habitat, e não à função dos microrganismos envolvidos (Hardoim et al., 2015).

Avanços nas pesquisas deste segmento da microbiota vegetal destacam a importância da comunidade endofítica na promoção do crescimento das plantas com as quais ela se associa (Schulz & Boyle, 2006; Lugtenberg et al., 2016). Essa promoção de crescimento ocorre através de diversos mecanismos, incluindo a produção de metabolitos secundários (e.g. alcaloides, fenóis, terpenos, etc.) e fito-hormônios, disponibilização de nutrientes e aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos (Zaidi et al., 2014; Vinale et al., 2017; Kavroulakis et al., 2018; Bader et al., 2019). Sugere-se, assim, o seu potencial biotecnológico na esfera agrícola como alternativa ambientalmente limpa, capaz de, se não substituir, pelo menos diminuir o uso de insumos químicos e, conseqüentemente, alguns dos problemas a estes associados, como contaminação do solo e da água e perda de biodiversidade (Lugtenberg et al., 2016; Bhatia & Mukherjee, 2018).

O Brasil lidera a lista de países produtores de cana-de-açúcar, sendo o principal produtor mundial da cultura (CONAB, 2019). A cana-de-açúcar é o terceiro maior cultivo brasileiro em área plantada, atrás apenas da soja e do milho. Em 2018, os canaviais ocuparam 10 milhões de hectares (IBGE, 2020), 13,7% da área plantada com culturas temporárias no país (IBGE, 2020). A cadeia produtiva da cana-de-açúcar no primeiro semestre de 2017 gerou um PIB (Produto Interno Bruto) de 156 bilhões de reais (CEPEA, 2017), o que representa uma estimativa de 2,3% do PIB brasileiro naquele ano. O estado de São Paulo é o maior produtor, tendo 5,5 milhões de hectares plantados em 2018, correspondendo a 55% da área plantada com cana no Brasil em 2018 (IBGE, 2020). A área plantada com cana-de-açúcar no Brasil cresceu de forma acelerada na década de 2000, com taxa média de 8,2% ao ano, com destaque para a região Sudeste, particularmente o estado de São Paulo (IBGE, 2017). Embora esse aumento de área seja na sua grande maioria resultado da conversão de pastagens em canaviais (IBGE, 2017), Cherubin et al. (2016) alertam sobre o efeito negativo desta transição nos atributos físicos e na biodiversidade do solo. De acordo com Bordonal et al. (2018) a estratégia chave da sustentabilidade na produção canavieira encontra-se no aumento da eficiência do manejo

agrícola da cultura, o qual pode ser alcançado, por exemplo, por meio da diminuição da aplicação de insumos químicos.

Segundo o censo varietal de cana-de-açúcar para a região Centro-Sul do Brasil, no ano de 2017-2018, a variedade RB966928 foi a mais plantada no estado de São Paulo (16,1% do plantio deste estado) e a segunda mais plantada na região Centro-Sul, ocupando 10,2% da área (Braga Júnior et al., 2018). O plantio desta variedade no estado de São Paulo apresenta uma tendência de crescimento, pois ela lidera as intenções de plantio, apresentando alto interesse para a pesquisa científica. A variedade apresenta elevada produtividade, com estabilidade de produção, colheita precoce a média, sendo colhida entre abril e julho, adaptável aos diferentes ambientes de produção da região Centro-Sul, apresentando boa qualidade, médio teor de sacarose, excelente germinação, perfilhamento e rebrota de soqueiras e elevada tolerância às principais doenças (RIDESA, 2010).

Diante da necessidade de aumentar a sustentabilidade da produção canavieira, um dos enfoques de pesquisa é o isolamento e detecção de microrganismos promotores do crescimento vegetal de variedades de interesse, pois esse representa o primeiro passo no caminho da obtenção de um produto biotecnológico eficiente (Agrawal et al., 2018). Apesar da importância da cana na agricultura brasileira e a urgente necessidade de implementação de alternativas sustentáveis a serem aplicadas na sua produção, são atualmente escassos os estudos abordando comunidades de fungos endofíticos associadas à cultura no Brasil (Mendes, 2008; Romão-Dumaresq et al., 2016; Sousa, 2017).

Desta forma, considerando o cenário previamente descrito em relação à crescente produção canavieira no país, e o estado de São Paulo como líder da produção nacional, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a comunidade de fungos endofíticos radiculares associada à variedade RB966928 de cana-de-açúcar cultivada no Estado de São Paulo, Brasil, e buscar relação da composição de espécies com as características químicas do solo rizosférico. Simultaneamente, objetivou-se depositar os isolados obtidos a partir do presente estudo na Coleção de Fungos do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner, estabelecendo assim as bases para estudos futuros envolvendo a prospecção biotecnológica destes fungos.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Amostragem

Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB966928, com a idade de primeira soqueira, foram coletadas em 24 pontos de amostragem, distribuídos em 16 municípios do estado de São Paulo (Tabela 8). Os pontos de amostragem foram distribuídos nas principais regiões produtoras de cana-de-açúcar no estado de São Paulo (Figura 19), abrangendo 9 mesorregiões (de um total de 15) e 13 microrregiões (de um total de 63) das divisões geográficas do IBGE (1990). Em cada ponto de amostragem uma touceira foi coletada contendo número variável de colmos.

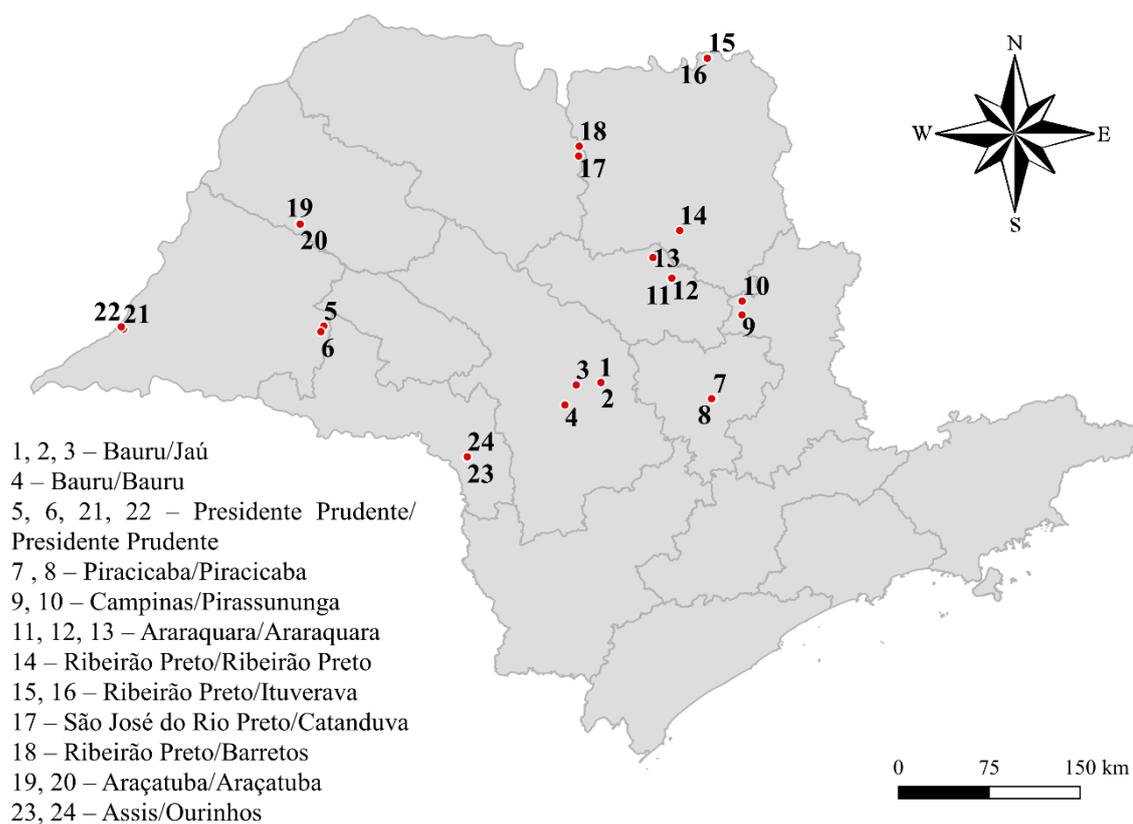


Figura 19. Localização dos pontos de amostragem (1-24) de touceiras de cana-de-açúcar da variedade RB966928 no Estado de São Paulo entre 26/05/2017 e 09/06/2017 para isolamento de endófitos fúngicos radiculares.

Tabela 8. Pontos de amostragem (1-24) de touceiras de cana-de-açúcar da variedade RB966928 no Estado de São Paulo para isolamento de fungos endofíticos das raízes.

Ponto	Data de coleta	Município de coleta	Georeferência			Usina/Associação	Detalhamento do local de coleta
			Latitude (°)	Longitude (°)	Altitude (m)		
1	26/05/17	Barra Bonita	-22,482677	-48,539833	516,6	Raízen - Matriz	Fazenda Santa Luiza, Cod. 90018, Zona 3, Talhão 6
2	26/05/17	Barra Bonita	-22,482672	-48,537865	533,7	Raízen - Matriz	Fazenda Santa Luiza, Cod. 90018, Zona 3, Talhão 5
3	29/05/17	Macatuba	-22,507843	-48,735630	453,2	Zilor - São José	Agricana, Lote 5234
4	29/05/17	Lençóis Paulista	-22,660450	-48,820736	599,0	Zilor - Barra Grande	Fazenda 31, Quadra 1-4, Lote 13
5	31/05/17	João Ramalho	-22,119173	-50,770607	504,3	Zilor - Quatá	Fazenda 79, Bloco 7969, Talhão RG 7
6	31/05/17	João Ramalho	-22,162348	-50,792412	487,9	Zilor - Quatá	Fazenda 79, Bloco 7995, Talhão RG 7
7	05/06/17	Piracicaba	-22,570032	-47,634644	634,8	Raízen - Costa Pinto	Fazenda Sta. Maria, Zona 32, Área 5012, Talhão 4
8	05/06/17	Piracicaba	-22,571505	-47,646542	635,5	Raízen - Costa Pinto	Fazenda Sta. Maria, Zona 32, Área 5012, Talhão 9
9	06/06/17	Pirassununga	-21,936201	-47,431511	565,6	Ferrari Agroindustria	Fazenda Tangará, Talhão 5
10	06/06/17	Porto Ferreira	-21,833317	-47,435333	563,1	Ferrari Agroindustria	Fazenda Eldorado, Talhão 11
11	06/06/17	Santa Lucia	-21,689596	-48,004169	572,7	São Martinho - Santa Cruz	Fazenda Capão das Perobas, Bloco 04, Talhão 1009
12	06/06/17	Santa Lucia	-21,682636	-48,003883	573,2	São Martinho - Santa Cruz	Fazenda Capão das Perobas, Bloco 06, Talhão 1005
13	06/06/17	Motuca	-21,534620	-48,159912	565,3	São Martinho - São Martinho	Fazenda São Sebastião, Quadra 1, Talhão 930
14	06/06/17	Ribeirão Preto	-21,325506	-47,955490	528,7	São Martinho - São Martinho	Fazenda Rio da Onça, Mapa 430, Talhão 81
15	07/06/17	Igarapava	-20,026957	-47,784267	621,8	Raízen - Junqueira	Sítio Sertãozinho, Código 77542, Zona 245, Talhão 5
16	07/06/17	Igarapava	-20,031263	-47,788864	580,9	Raízen - Junqueira	Fazenda São José, Zona 278, Talhão 6
17	07/06/17	Severínia	-20,794701	-48,778442	558,5	Canaoeste	Fazenda Ibiúna, Talhão 5
18	07/06/17	Barretos	-20,721260	-48,775848	511,7	Canaoeste	Fazenda Marisa, Talhão 708A
19	08/06/17	Valparaíso	-21,350294	-50,979820	367,9	Raízen - Univalen	Fazenda Cascata, Zona 122, Talhão 2
20	08/06/17	Valparaíso	-21,358130	-50,975574	348,6	Raízen - Univalen	Fazenda Cascata, Zona 122, Talhão 4
21	08/06/17	Presidente Epitácio	-22,166634	-52,373528	386,2	Atvos – Conquista do Pontal	Fazenda São Donato, Código 120021, Talhão 12
22	08/06/17	Presidente Epitácio	-22,148911	-52,389587	304,6	Atvos – Conquista do Pontal	Fazenda São Donato, Código 120021, Talhão 25
23	09/06/17	Ipaussu	-23,077879	-49,594246	678,7	Raízen - Ipaussu	Fazenda Santo Antônio, Zona 9, Talhão 5
24	09/06/17	Ipaussu	-23,071531	-49,591835	647,0	Raízen - Ipaussu	Fazenda Santo Antônio, Zona 6, Talhão 3

Os colmos foram cortados, mantendo seu terço inferior junto à touceira, a qual foi retirada após da escavação do seu entorno, junto com o torrão de solo rizosférico, mantendo o sistema radicular o mais intacto possível. A touceira e o torrão foram então transferidos para um saco de rafia de 0,60x0,90m, o qual foi fechado, identificado, e transportado ao Laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia em Seropédica, RJ, sob condições de temperatura ambiente e sombra. Desta forma, garantiu-se o transporte das touceiras com as raízes vivas até o procedimento de isolamento dos fungos endofíticos. A análise química do solo rizosférico amostrado no torrão de cada ponto de amostragem é apresentada na tabela 9.

Tabela 9. Características químicas dos solos rizosféricos amostrados em cada ponto de amostragem das touceiras de cana-de-açúcar da variedade RB966928 (1ª soqueira) coletadas no estado de São Paulo, durante os meses de maio e junho de 2017 para isolamento de fungos endofíticos radiculares.

Pontos de amostragem	pH	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	C	N
		---- mg/L ----		----- cmolc/dm ³ -----				----g/kg----	
1	4,99	16,22	158,31	3,76	1,63	8,30	0,23	12,0	1,7
2	4,94	57,17	109,66	4,26	1,55	8,91	0,15	15,3	1,7
3	5,67	17,24	104,52	4,09	0,44	3,35	0,00	5,8	1,0
4	6,51	10,58	154,00	2,51	1,36	2,33	0,00	7,5	0,9
5	5,90	7,45	87,79	1,08	0,60	1,91	0,00	4,0	0,5
6	6,17	11,66	52,14	1,42	0,69	1,45	0,00	4,0	0,5
7	6,34	33,95	320,75	3,29	1,21	2,77	0,00	16,3	1,5
8	5,83	29,61	127,34	1,87	0,62	2,33	0,25	6,9	0,8
9	5,19	25,53	56,38	1,26	0,38	3,32	0,09	6,4	0,6
10	6,04	7,25	230,94	2,18	0,82	3,33	0,00	10,7	1,1
11	5,96	9,69	171,56	1,67	0,83	2,94	0,04	8,6	0,8
12	5,70	16,29	82,66	2,05	0,89	3,43	0,00	7,9	0,9
13	5,65	2,63	138,57	1,65	1,08	5,58	0,02	14,4	1,4
14	6,28	18,26	197,89	2,96	1,46	3,76	0,00	13,0	1,4
15	7,06	23,96	96,98	3,10	0,96	2,19	0,00	5,9	0,8
16	6,06	9,08	66,84	1,98	0,54	4,17	0,00	8,7	0,9
17	6,25	9,15	84,17	2,74	0,80	2,11	0,00	6,2	0,9
18	5,68	3,17	74,66	1,44	0,74	2,77	0,03	4,5	0,5
19	6,26	83,90	38,41	2,31	1,02	2,28	0,00	6,0	0,7
20	5,71	45,85	52,30	1,98	0,71	2,44	0,02	4,6	0,6
21	5,79	46,39	91,44	1,32	0,63	2,28	0,00	4,6	0,7
22	5,73	16,22	75,84	0,71	0,48	1,95	0,00	4,8	0,5
23	6,08	39,80	226,40	6,24	2,45	5,58	0,00	24,5	2,2
24	6,09	69,22	597,46	4,76	2,38	4,41	0,00	13,5	1,4

Análise realizada conforme Nogueira & Souza (2005).

4.4.2 Isolamento de endófitos fúngicos radiculares

Para cada touceira amostrada, 50 segmentos de raízes de 3-5 mm, previamente desinfetados (Ribeiro et al., 2011; capítulo 1 desta tese), foram colocados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo os meios extrato de malte-ágar (MEA) – 5 placas – e batata-dextrose-ágar (BDA) – 5 placas – ambos suplementados com sulfato de gentamicina (0,1 g/L)

e estreptomicina (0,05 g/L) para inibir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas no escuro a 27°C. Os fungos que cresceram a partir das extremidades dos segmentos radiculares foram transferidos a placas de Petri contendo MEA fresco e mantidos em iguais condições de incubação.

Os fungos isolados foram preservados utilizando os métodos Castellani e criopreservação. Em ambos os casos se retiraram discos de 5 cm de diâmetro de colônias de aproximadamente 15 dias crescendo em meio MEA. No caso de método Castellani os discos foram transferidos para tubos de 2 mL contendo água destilada estéril, e mantidos em refrigeração (4°C). Para a criopreservação preparou-se uma solução de extrato de malte e glicerina, a qual foi posteriormente esterilizada em autoclave a 121°C. Os discos foram assim transferidos para tubos criogênicos de 2 mL contendo esta solução, e gradativamente congelados (4°C por 1 hora, -18°C por 1 hora) até ser finalmente mantidos a uma temperatura de -80°C. Posteriormente, os isolados preservados foram cedidos à coleção de fungos do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ.

4.4.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

A extração de DNA dos fungos isolados foi realizada a partir de micélio retirado na forma de discos de 7 mm de diâmetro da bordadura externa de colônias em crescimento. A maceração do micélio foi realizada em microtubos de 0,5 mL contendo pérolas de vidro ($\leq 106 \mu\text{m}$ G8893 Sigma Aldrich) com auxílio de pistilo estéril. Utilizou-se o kit PrepMan® *Sample Preparation Reagent* (Applied Biosystems) conforme instruções do protocolo do fabricante.

Os primers ITS1F e ITS4 (White et al., 1990) foram utilizados na reação de PCR para amplificar a região do espaço interno transcrito (ITS - *Internal transcribed spacer*) do gene do rDNA. A mistura da reação utilizada por amostra é descrita a seguir para um volume final de 25 μL : 0,2 mM de dNTP, 3 mM de MgCl_2 , 1X *Colorless Gotaq Flexi Buffer* (Promega), 0,625U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega), 0,2 μM de cada primer, 12,875 μL de água ultrapura para PCR e 2 μL de DNA diluído 1/10 (v/v). O programa da PCR foi constituído pelas seguintes etapas: Desnaturação inicial a 95°C por dois minutos; 35 ciclos de desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (52°C por 45 segundos) e alongamento (72°C por dois minutos); alongamento final a 72°C por cinco minutos; e manutenção a 4°C até retirada das amostras do termociclador.

A técnica de eletroforese em gel de agarose 1% foi utilizada para confirmar o resultado da PCR, ao tempo que o Kit Qubit® dsDNA BR Invitrogen permitiu a quantificação do DNA amplificado. O DNA resultante da PCR foi enzimaticamente purificado em reação simultânea com Exonuclease I (20U/ μL) e FastAP Fosfatase Alcalina Termosensível (1U/ μL). A marcação do DNA para sequenciamento foi realizada utilizando o kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems™), seguida de purificação em etanol e injeção em analisador genético 3500 Applied Biosystems™. As extremidades das sequências, com baixa qualidade, foram retirados usando o programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd.). A ferramenta BLASTn 2.8.0 (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) (Zhang et al., 2000; Morgulis et al., 2008) permitiu a comparação das sequências obtidas com aquelas previamente depositadas na base GenBank® do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) da “U.S. National Library of Medicine”. O valor de corte referente aos resultados do BLASTn foi delimitado a uma percentagem de identidade (*percent identity*) entre 95 e 100%.

O alinhamento das sequências referentes aos fungos aqui isolados e sequências similares retiradas do GenBank foi realizado utilizando a ferramenta ClustalW no programa MEGA versão X (Kumar et al., 2018). Análises de máxima verossimilhança (ML – *Maximum Likelihood*) foram conduzidas usando o modelo de substituição nucleotídica GTR (*General Time Reversible*). O suporte das ramas foi verificado por meio de análise de ML *bootstrap* com

1000 réplicas. As análises previamente referidas assim como a visualização e edição das árvores filogenéticas também foram realizadas no programa MEGA versão X (Kumar et al., 2018). Os nomes de espécies foram verificados quanto a sinonímias e nomenclatura mais atual nas bases taxonômicas MycoBank (2019) e Index Fungorum (2019), e os nomes correntes adotados neste trabalho.

4.4.4 Análise dos dados

Foi calculada a frequência relativa (FR) para representar o número de isolados de cada espécie em relação ao número total de isolados. A frequência de ocorrência (FO) foi calculada a partir do número de amostras nas quais uma determinada espécie esteve presente em relação ao número total de amostras coletadas. Em função da FO as espécies foram classificadas como dominantes ($FO > 50\%$), muito comuns ($30\% < FO \leq 50\%$), comuns ($10\% < FO \leq 30\%$) e raras ($FO \leq 10\%$) (Zhang et al., 2004).

Uma curva de acumulação de espécies, considerando os 24 canaviais amostrados, foi construída usando 1000 permutações aleatorizadas (*Random model*) para avaliar a suficiência amostral. Realizou-se uma análise multivariada de redundância (RDA) para avaliar quanto da dinâmica das espécies foi explicada por gradientes nas variáveis ambientais, no caso as características químicas do solo rizosférico das plantas amostradas (Al, C, Ca, H+Al, K, Mg, P e pH). A significância da RDA foi avaliada por meio de teste de 999 permutações dos resíduos do modelo reduzido ($p \leq 0,05$) (*Reduced model*). As análises estatísticas foram conduzidas usando o pacote Vegan do Programa R, versão RStudio (Okansen et al., 2019).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Isolamento de endófitos fúngicos radiculares

No total, foram obtidos 391 isolados de fungos endofíticos a partir das raízes de cana-de-açúcar amostradas (Tabela 10). Destes, 320 (82%) tiveram as suas sequências de DNA analisadas com sucesso, restando 18% dos isolados sem sucesso na identificação molecular. Foram isolados e identificados fungos endofíticos a partir de todas as 24 amostras coletadas, sendo que o número de isolados variou de 5 a 35 isolados por amostra, com média de 16 isolados por amostra. A percentagem de identificação por sequenciamento dos isolados por ponto de amostragem variou de 60 a 100%.

A análise filogenética de máxima verossimilhança utilizando as sequências da região ITS dos fungos isolados e sequências similares retiradas da base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2019) indicou a ocorrência de pelo menos 49 espécies integrando a comunidade de fungos endofíticos radiculares da variedade RB966928 de cana-de-açúcar cultivada no estado de São Paulo (Tabela 11). A curva de acumulação de espécies se aproximou da estabilidade (Figura 20), indicando boa suficiência do esforço amostral na detecção da riqueza de fungos endofíticos associados às raízes da cana-de-açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo.

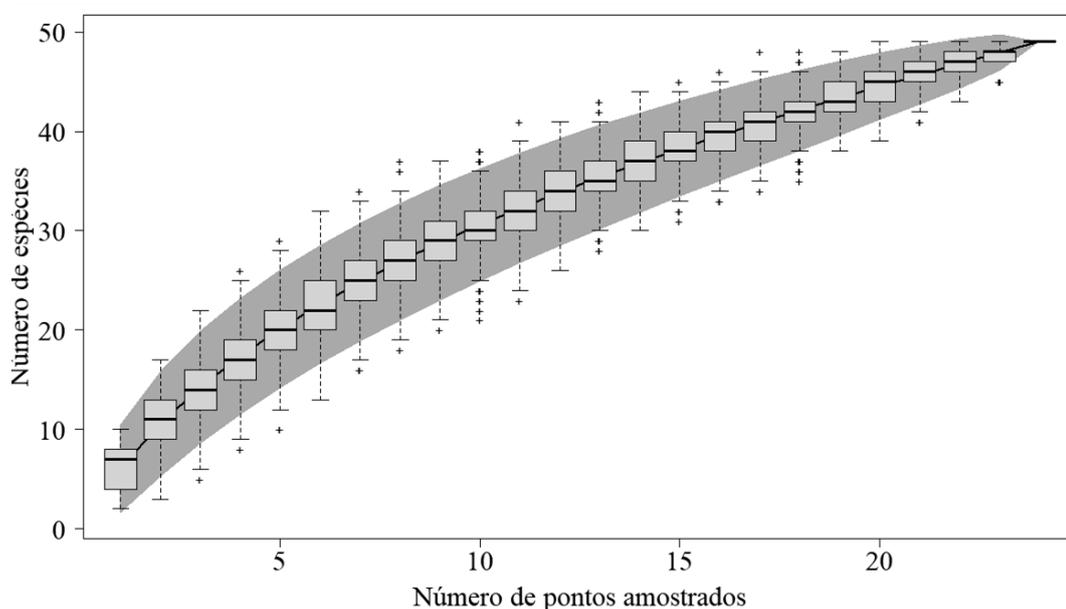


Figura 20. Curva de acumulação de espécies da comunidade de fungos endofíticos radiculares de cana-de-açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo e amostrada entre maio e junho de 2017. Curva estimada a partir de 1000 permutações aleatorizadas. Boxplots representam a distribuição dos dados e a sombra cinza o intervalo de confiança de 95%.

Tabela 10. Parâmetros contabilizados da comunidade de fungos endofíticos isolados de raízes de cana-de-açúcar açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo em 24 amostras coletadas entre maio e junho de 2017.

Parâmetros contabilizados	Pontos de amostragem																								Total das 24 amostras
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Número de isolados de Ascomycota	17	4	22	7	7	10	3	8	10	8	18	14	9	11	21	11	9	20	6	15	10	18	5	10	273
Número de isolados de Basidiomycota	1	0	9	0	1	2	0	0	1	0	0	1	1	0	2	3	11	1	10	0	2	1	1	0	47
Número de isolados não sequenciados	4	1	4	0	1	2	2	3	1	2	5	7	2	1	6	3	7	3	8	2	2	2	3	0	71
Número total de isolados por amostra	22	5	35	7	9	14	5	11	12	10	23	22	12	12	29	17	27	24	24	17	14	21	9	10	391
Número de espécies identificadas de Ascomycota	8	2	7	4	3	6	2	4	6	3	8	6	6	6	8	7	6	7	5	4	5	6	5	3	42
Número de espécies identificadas de Basidiomycota	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1	2	1	2	0	1	1	1	0	7
Número total de espécies identificadas por amostra	9	2	8	4	4	7	2	4	7	3	8	7	7	6	10	8	8	8	7	4	6	7	6	3	49
Porcentagem de isolados identificados em relação ao total	82	80	89	100	89	86	60	73	92	80	78	68	83	92	79	82	74	88	67	88	86	90	67	100	82

Uma lista de todos os 391 isolados ordenados por ponto de amostragem é apresentada no anexo da tese na tabela A1.

Tabela 11. Espécies de fungos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar RB966928 identificadas por análise filogenética da região ITS por verossimilhança com sequências disponíveis na base de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI).

Classe	Subclasse	Ordem	Família	Gênero	Espécie ou identificação mais próxima a espécie
Filo Ascomycota; Subfilo Pezizomycotina					
Dothideomycetes	Dothideomycetidae	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i> sp.
Dothideomycetes	Pleosporomycetidae	Pleosporales	Periconiaceae	<i>Periconia</i>	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
Dothideomycetes	Pleosporomycetidae	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Curvularia</i>	<i>Curvularia</i> sp.
Dothideomycetes	Pleosporomycetidae	Pleosporales	—	—	Pleosporales sp. 1
Dothideomycetes	Pleosporomycetidae	Pleosporales	—	—	Pleosporales sp. 2 (Ascomycota sp. 2)
Eurotiomycetes	Chaetothyriomycetidae	Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Rhinocladiella</i>	<i>Rhinocladiella similis</i> de Hoog & Caligiome (2003)
Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus novoparasiticus</i> S.S. Gonçalves, Stchigel, Cano, Godoy-Martinez, Colombo & Guarro (2011)
Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx (1901)
Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1
Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp. 2
Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Talaromyces</i>	<i>Talaromyces</i> sp.
Leotiomycetes	Leotiomycetidae	Helotiales	—	—	Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)
Sordariomycetes	Diaporthomycetidae	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Phaeocytostroma</i>	<i>Phaeocytostroma ambiguum</i> (Mont.) Petr. (1927)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier (1906)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> sp. 1
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> sp. 2
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium annulatum</i> Bugnic. (1952)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium begoniae</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium nygamai</i> L.W. Burgess & Trimboli (1986)
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp. 1
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp. 2

Classe	Subclasse	Ordem	Família	Gênero	Espécie ou identificação mais próxima a espécie
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp. 3
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp. 4
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	—	Nectriaceae sp.
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Stachybotryaceae	—	Stachybotryaceae sp.
Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	—	—	Hypocreales sp. (Ascomycota sp. 1)
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Coniochaetales	Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta</i>	<i>Coniochaeta decumbens</i> (J.F.H. Beyma) Z.U. Khan, Gené & Guarro (2013)
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Magnaporthales*	Magnaporthaceae	<i>Pseudophialophora</i>	<i>Pseudophialophora tarda</i> J. Luo & N. Zhang (2015)
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Magnaporthales*	Magnaporthaceae	—	Magnaporthaceae sp.
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Magnaporthales*	—	—	Magnaporthales sp. 1
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Magnaporthales*	—	—	Magnaporthales sp. 2
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Arcopilus</i>	<i>Arcopilus aureus</i> (Chivers) X. Wei Wang & Samson (2016)
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr. (1829)
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium strumarium</i> (J.N. Rai, J.P. Tewari & Mukerji) P.F. Cannon (1986)
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Pseudothielavia</i>	<i>Pseudothielavia terricola</i> (J.C. Gilman & E.V. Abbott) X. Wei Wang & Houbraken (2019)
Sordariomycetes	Sordariomycetidae	Sordariales	Chaetomiaceae	—	Chaetomiaceae sp
Sordariomycetes	Xylariomycetidae	Xylariales	Apiosporaceae	<i>Nigrospora</i>	<i>Nigrospora</i> sp.
Filo Basidiomycota; Subfilo Agaricomycotina					
Agaricomycetes	Agaricomycetidae	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Marasmius</i>	<i>Marasmius</i> sp. 1
Agaricomycetes	Agaricomycetidae	Agaricales	Marasmiaceae	<i>Marasmius</i>	<i>Marasmius</i> sp. 2
Agaricomycetes	Agaricomycetidae	Agaricales	Omphalotaceae	<i>Marasmiellus</i>	<i>Marasmiellus</i> sp.
Agaricomycetes	Incertae sedis	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	—	Ceratobasidiaceae sp. (<i>Rhizoctonia/Ceratobasidium</i>)
Agaricomycetes	Incertae sedis	Hymenochaetales	Rickenellaceae	<i>Resinicium</i>	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
Agaricomycetes	Incertae sedis	Polyporales	Polyporaceae	<i>Corioloopsis</i>	<i>Corioloopsis</i> sp.
Filo Basidiomycota; Subfilo Pucciniomycotina					
Atractiellomycetes	Incertae sedis	Atractiellales	—	—	<i>Atractiellales</i> sp.

As nomenclaturas dos táxons foram confirmadas nas bases de dados MycoBank ou Index Fungorum; *ordem não listada em ambas as bases (Mycotaxon e Index Fungorum).

Aproximadamente, 85% dos fungos (273 isolados) e 42 das espécies verificadas, foram identificados como pertencentes ao filo Ascomycota; Subfilo Pezizomycotina. O filo Basidiomycota esteve representado por 15% dos isolados (47 isolados) e sete espécies (Tabela 10), sendo a maioria do Subfilo Agaricomycotina, e apenas uma espécie do Subfilo Pucciniomycotina (Tabela 11). A análise filogenética foi separada por filo. Adicionalmente, os gêneros *Trichoderma* e *Fusarium*, ambos do filo Ascomycota, foram analisados separadamente por constituírem grupos com grande número de isolados e para os quais a região ITS não apresenta um bom nível de resolução na identificação de espécies (Raja et al., 2017).

A análise de dominância com base na frequência de ocorrência ou proporção de touceiras a partir das quais cada espécie foi isolada, indicou uma comunidade de fungos endofíticos integrada principalmente por espécies raras (65%), e um baixo número de espécies dominantes (4%) (Tabela 12). Constituíram esta última categoria apenas as espécies *Periconia macrospinosa* (Pleosporales) e *Fusarium* sp. 3 (Hypocreales), ambas do filo Ascomycota e com valores de frequência de ocorrência de 54,2 e 66,7%, respectivamente. Em relação ao número de isolados, representado pela frequência relativa, estas duas espécies também se destacaram por apresentar os maiores valores, sendo estes de 13,0% no caso de *P. macrospinosa* e 11,3% para *Fusarium* sp. 3. As espécies consideradas comuns foram 27% do número total de espécies identificadas, e as consideradas muito comuns foram apenas duas espécies, *Fusarium acutatum* e *Trichoderma harzianum*, número igual ao das dominantes. Por outro lado, 28 espécies (57%) ocorreram na forma de *singletons*, sendo representadas no máximo por dois isolados, o que é comum em levantamentos taxonômicos baseados em sequenciamento (Lim et al., 2012).

A falta de significância estatística ($p \leq 0,05$) derivada do Teste com 999 permutações dos resultados da análise de redundância (RDA) indicou ausência de relação entre a ocorrência dos táxons (espécies, gêneros, famílias ou ordens) de fungos endofíticos radiculares e as características químicas do solo rizosférico das plantas a partir das quais foram isolados.

Tabela 12. Frequência relativa (FR), frequência de ocorrência (FO) e nível de dominância de espécies de fungos endofíticos isolados de raízes de cana-de-açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo, Brasil.

Identificação mais próxima	FR (%)	FO (%)	Nível de dominância
<i>Cladosporium</i> sp.	0,3	4,2	R
<i>Periconia macrospinosa</i>	13,0	54,2	D
<i>Curvularia</i> sp.	0,3	4,2	R
Pleosporales sp. 1	0,5	4,2	R
Pleosporales sp. 2 (Ascomycota sp. 2)	1,0	12,5	C
<i>Rhinochrysiella similis</i>	0,3	4,2	R
<i>Aspergillus novoparasiticus</i>	0,3	4,2	R
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0,5	8,3	R
<i>Penicillium javanicum</i>	2,0	20,8	C
<i>Penicillium</i> sp. 1	0,3	4,2	R
<i>Penicillium</i> sp. 2	0,3	4,2	R
<i>Talaromyces</i> sp.	4,3	20,8	C
Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)	1,8	12,5	C
<i>Phaeocytostroma ambiguum</i>	0,3	4,2	R
<i>Trichoderma asperellum</i>	2,6	20,8	C

<i>Trichoderma hamatum</i>	1,0	12,5	C
<i>Trichoderma harzianum</i>	5,6	37,5	VC
<i>Trichoderma virens</i>	3,8	16,7	C
<i>Trichoderma</i> sp. 1	0,5	8,3	R
<i>Trichoderma</i> sp. 2	1,8	29,2	C
<i>Fusarium acutatum</i>	5,6	50,0	VC
<i>Fusarium annulatum</i>	0,8	4,2	R
<i>Fusarium begoniae</i>	0,3	4,2	R
<i>Fusarium nygamai</i>	0,3	4,2	R
<i>Fusarium</i> sp. 1	0,5	8,3	R
<i>Fusarium</i> sp. 2	0,8	4,2	R
<i>Fusarium</i> sp. 3	11,3	66,7	D
<i>Fusarium</i> sp. 4	0,3	4,2	R
Nectriaceae sp.	1,3	16,7	C
Stachybotryaceae sp.	0,5	4,2	R
Hypocreales sp. (Ascomycota sp. 1)	0,3	4,2	R
<i>Pseudothielavia terricola</i>	0,5	8,3	R
<i>Coniochaeta decumbens</i>	0,3	4,2	R
<i>Pseudophialophora tarda</i>	0,3	4,2	R
Magnaporthaceae sp.	0,8	8,3	R
Magnaporthales sp. 1	0,3	4,2	R
Magnaporthales sp. 2	0,3	4,2	R
<i>Arcopilus aureus</i>	0,5	4,2	R
<i>Chaetomium globosum</i>	0,3	4,2	R
<i>Chaetomium strumarium</i>	0,3	4,2	R
Chaetomiaceae sp.	3,8	16,7	C
<i>Nigrospora</i> sp.	0,5	8,3	R
<i>Marasmius</i> sp. 1	2,3	4,2	R
<i>Marasmius</i> sp. 2	2,8	12,5	C
<i>Marasmiellus</i> sp.	0,5	4,2	R
Ceratobasidiaceae sp. (<i>Rhizoctonia/Ceratobasidium</i>)	1,3	16,7	C
<i>Resinicium saccharicola</i>	4,6	29,2	C
<i>Corioloropsis</i> sp.	0,3	4,2	R
<i>Atractiellales</i> sp.	0,3	4,2	R

FR: Frequência relativa (%) representa o número de isolados de uma determinada espécie em relação ao número total de isolados.

FO: Frequência de ocorrência (%) representa o número de amostras na qual uma determinada espécie foi verificada em relação ao número total de amostras.

Nível de dominância: **D** - dominante, **VC**- muito comum, **C**- comum, **R**- rara (Zhang et al., 2004)

4.5.2 Filo Ascomycota

As 42 espécies de fungos endofíticos identificadas como pertencentes ao filo Ascomycota (86% das espécies identificadas) distribuíram-se em quatro classes, nove

subclasses, 11 ordens e pelo menos 14 famílias. A classe de maior ocorrência foi Sordariomycetes com 29 espécie, seguida da Eurotiomycetes com sete espécies, Dothideomycetes com cinco espécies e Leotiomycetes com apenas uma espécie (Tabela 11). Dentro da classe Sordariomycetes, foram verificadas espécies pertencentes a seis ordens, sendo a mais comum, a ordem Hypocreales com 145 isolados e 17 espécies, respectivamente (Figura 21). Outras classes/ordens bem representadas dentro de Ascomycota foram Dothideomycetes/Pleosporales, Eurotiomycetes/Eurotiales e Sordariomycetes/Sordariales com 58, 30 e 21 isolados; e 4, 6 e 5 espécies cada uma. Por outro lado, ordens como Capnodiales, Chaetothyriales, Helotiales, Diaporthales, Coniochaetales e Xylariales foram representadas por apenas uma espécie, tendo Capnodiales, Chaetothyriales, Diaporthales e Coniochaetales apenas um isolado.

A ordem com maior número de isolados e espécies, Hypocreales, esteve representada principalmente pelos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma*, e em menor medida por isolados identificados apenas até ao nível de família (Nectriaceae sp. e Stachybotryaceae sp.) ou ordem (Hypocreales sp.). A árvore filogenética resultante da análise de máxima verossimilhança dos isolados compreendidos dentro do gênero *Fusarium* e as respectivas sequências tipo resultantes do BLAST encontra-se representada na Figura 22. No total, 77 isolados foram identificados como pertencentes a este gênero, resultando assim o gênero com maior número isolados. Embora a identidade de alguns isolados aproximou-se apenas do nível de gênero, no caso de outros verificou-se afinidade pelas espécies *F. begoniae*, *F. acutatum*, *F. anulatum* e *F. nygamai*. Excetuando as espécies *Fusarium* sp. 3 e *F. acutatum*, classificadas como dominante e muito comum, respectivamente, o resto das espécies do gênero foram consideradas raras.

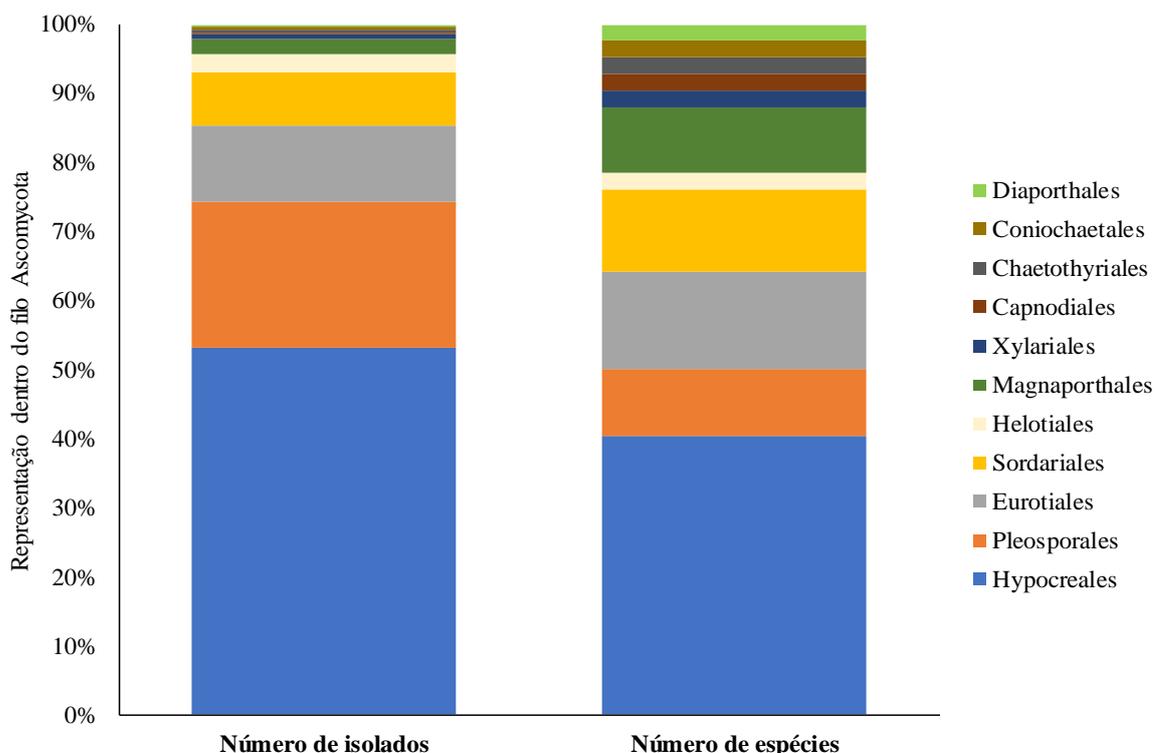


Figura 21. Percentagem de isolados e espécies por ordem do filo Ascomycota de endófitos fúngicos radiculares isolados de cana-de-açúcar (RB966928) cultivada no estado de São Paulo, Brasil.

O gênero *Trichoderma*, com 60 isolados, foi o segundo mais comum considerando o número total de isolados. Os fungos identificados dentro deste gênero diferenciaram-se em seis

grupos, dois dos quais foram identificados apenas até o nível de gênero, enquanto os outros quatro apresentaram afinidade pelas espécies *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. harzianum* e *T. virens* (Figura 23). Nenhuma das espécies identificadas dentro do gênero foi dominante. Porém, apenas *Trichoderma* sp. 1 foi considerada rara, enquanto o resto das espécies ficou nas categorias de comum e muito comum.

A ordem Pleosporales diferenciou-se em quatro espécies ou grupos de isolados, com afinidade por *Curvularia* sp., *P. macrospinoso*, e mais dois grupos identificados apenas até o nível de ordem (Pleosporales sp. 1 e Pleosporales sp. 2) (Figura 24). Embora a ordem compreendeu uma das poucas espécies dominantes da comunidade (*P. macrospinoso*), entre as demais, apenas Pleosporales sp. 2 foi classificada como comum, enquanto *Curvularia* sp. e Pleosporales sp. 1 foram consideradas raras.

A ordem Eurotiales foi representada pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*. *Aspergillus* caracterizou-se por baixa frequência relativa (0,3%) e de ocorrência (4,2%), com apenas um isolado que mostrou afinidade por *A. novoparasiticus*. No caso de *Penicillium*, verificaram-se quatro grupos, dois dos quais foram identificados até o nível de gênero (*Penicillium* sp. 1 e sp. 2) e duas espécies que mostraram afinidade por *P. brevicompactum* e *P. javanicum*, respectivamente (Figura 24). No caso desta última espécie existe divergência na sua classificação nos gêneros *Penicillium* ou *Eupenicillium*, entre as bases de dados MycoBank e Index Fungorum, sendo no presente trabalho adotado como pertencente ao gênero *Penicillium*, conforme Visagie et al. (2014). Representada por oito isolados e presente em cinco das localidades amostradas, *P. javanicum* foi considerada comum. Por último, os isolados de *Talaromyces* formaram um único grupo ou espécie, considerada comum dentro da comunidade, com valores de frequência de ocorrência de 20,8%.

A ordem Sordariales compreendeu os gêneros *Arcopilus*, *Chaetonium* e *Pseudothielavia*. Este último gênero foi recentemente criado (Wang et al., 2019), de forma que no GenBank e no presente trabalho (figura 24 e discussão) ainda é referido o nome anterior do gênero, *Thielavia*). Adicionalmente, um grupo de isolados foi identificado até o nível de família como Chaetomiaceae sp. As espécies *Arcopilus aureus*, *Chaetonium globosum*, *Chaetonium strumarium* e *Thielavia terricola*, foram todas identificadas como raras, com frequências de ocorrência inferiores a 10% e relativa de até 0,6%. Apenas o grupo de isolados definidos como Chaetomiaceae sp. ocupou a categoria de comum, com uma frequência de ocorrência de 16,7% e relativa de 3,8%.

A ordem Magnaporthales se diferenciou em quatro grupos, porém foi representada por apenas seis isolados, todos raros. Um destes grupos mostrou afinidade pela espécie *Pseudophialophora tarda*, enquanto os demais isolados foram classificados até ao nível de família (Magnaporthaceae sp.) ou ordem (Magnaporthales sp. 1 e sp. 2). As demais ordens verificadas (Capnodiales, Chaetothyriales, Helotiales, Diaporthales, Melanosporales, Coniochaetales e Xylariales) foram representadas apenas por uma espécie. Somente a espécie de Helotiales (Helotiales sp.) foi classificada como comum, com uma frequência de ocorrência de 12,5%. Os isolados desta ordem formaram um único grupo, sugerindo que pertencem a uma mesma espécie, com afinidade pelos gêneros *Phialocephala* e *Acephala*. Outras espécies foram representadas por *singletons* e consideradas raras dentro da comunidade sendo: *Cladosporium* sp. (Capnodiales), *Rhinochlaia similis* (Chaetothyriales), *Coniochaeta decumbens* (Coniochaetales), *Phaeocystostroma ambiguum* (Diaporthales) e *Nigrospora* sp. (Xylariales).

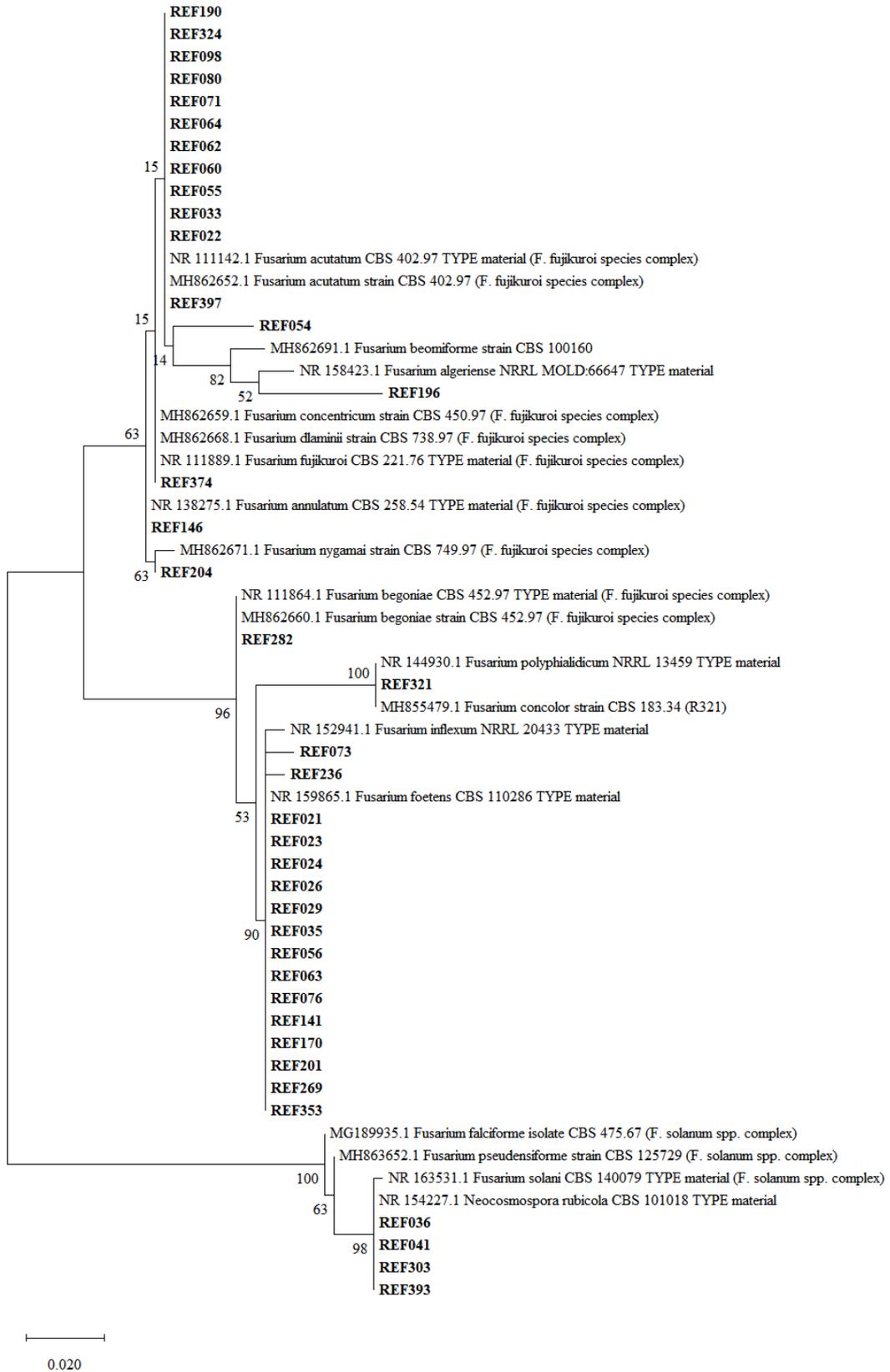


Figura 22. Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de isolados de endófitos radiculares isolados de cana-de-açúcar RB966928 agrupados dentro do gênero *Fusarium* e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000.

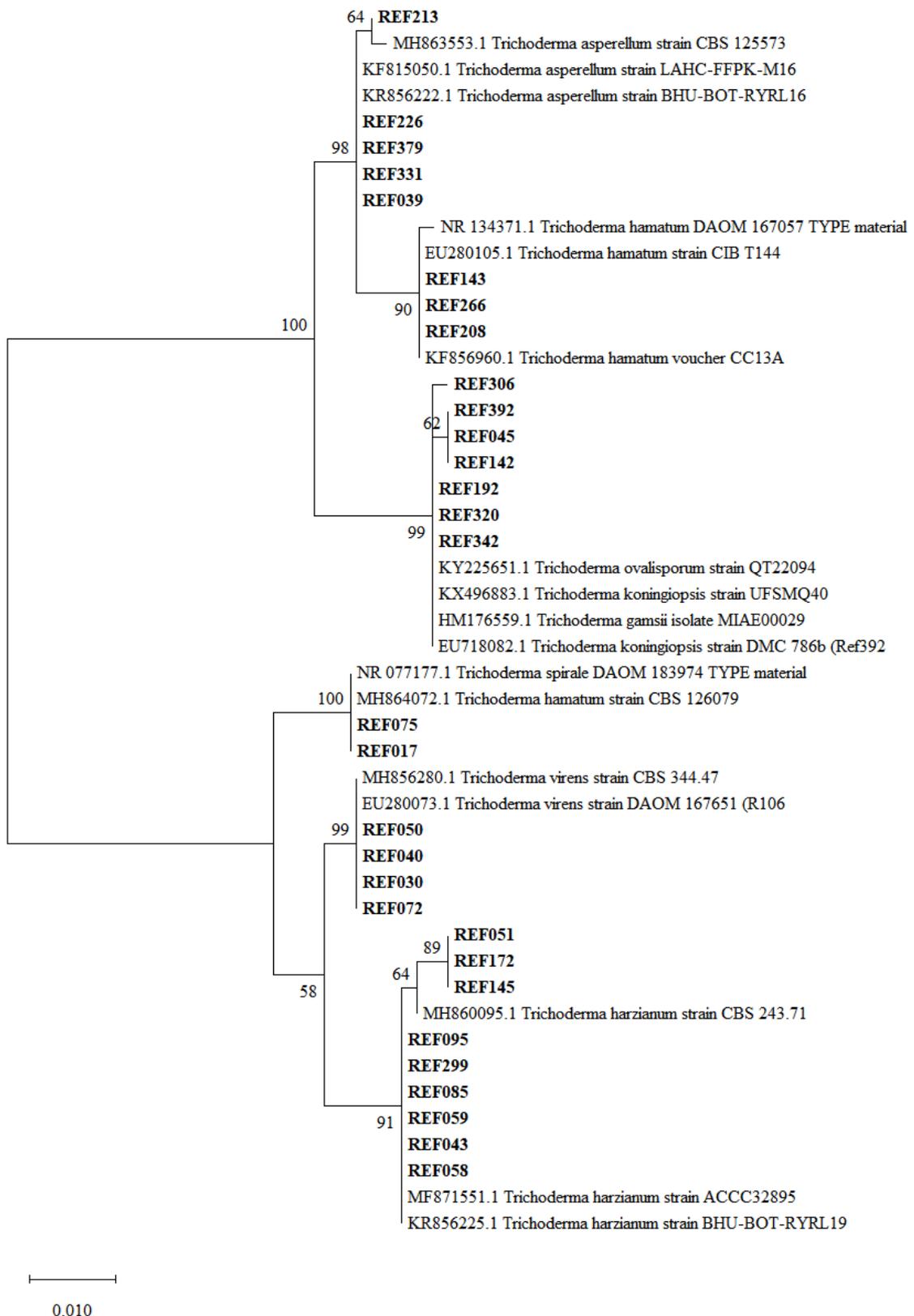


Figura 23. Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de isolados representativos de cada espécie dentro do gênero *Trichoderma* e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000.

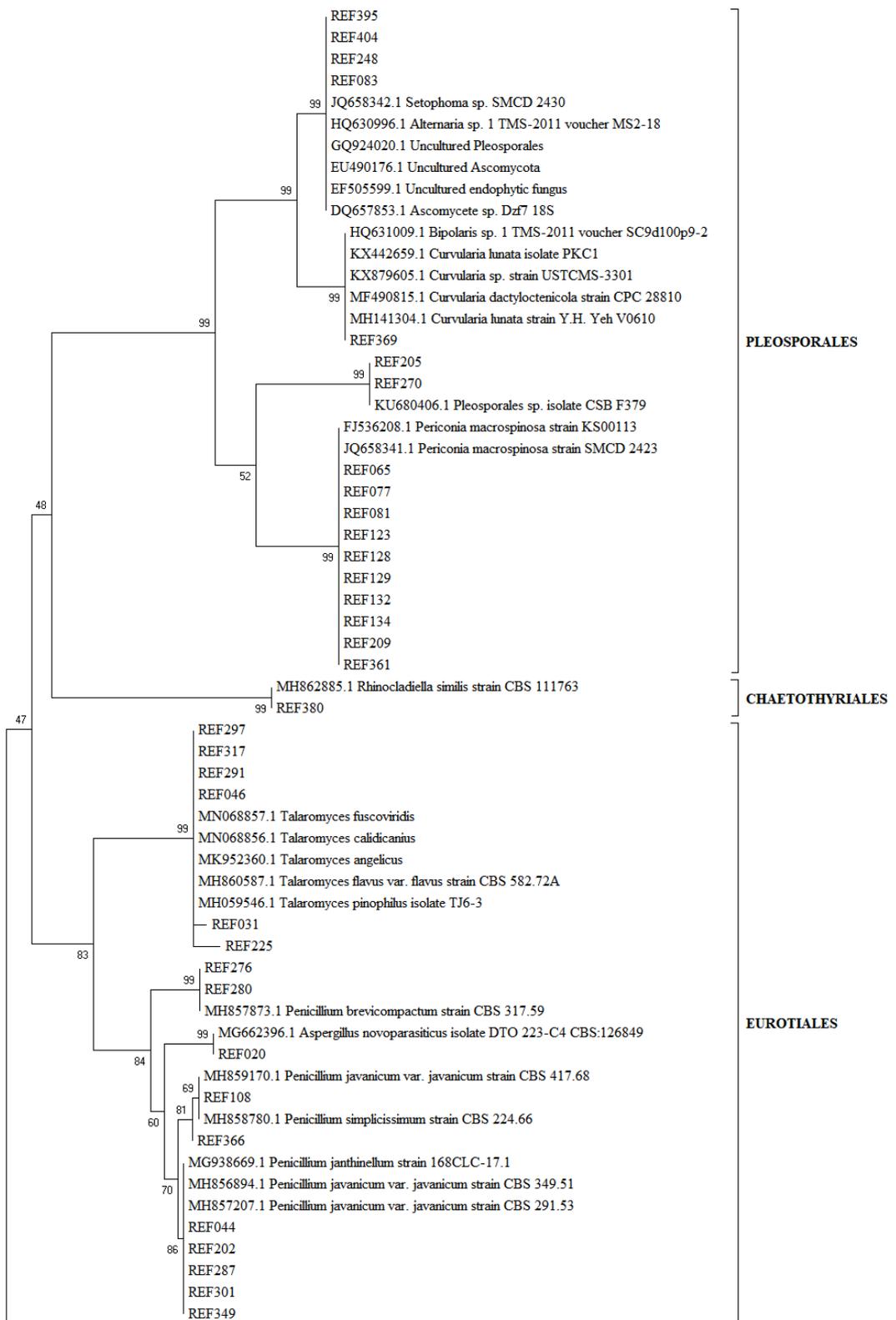
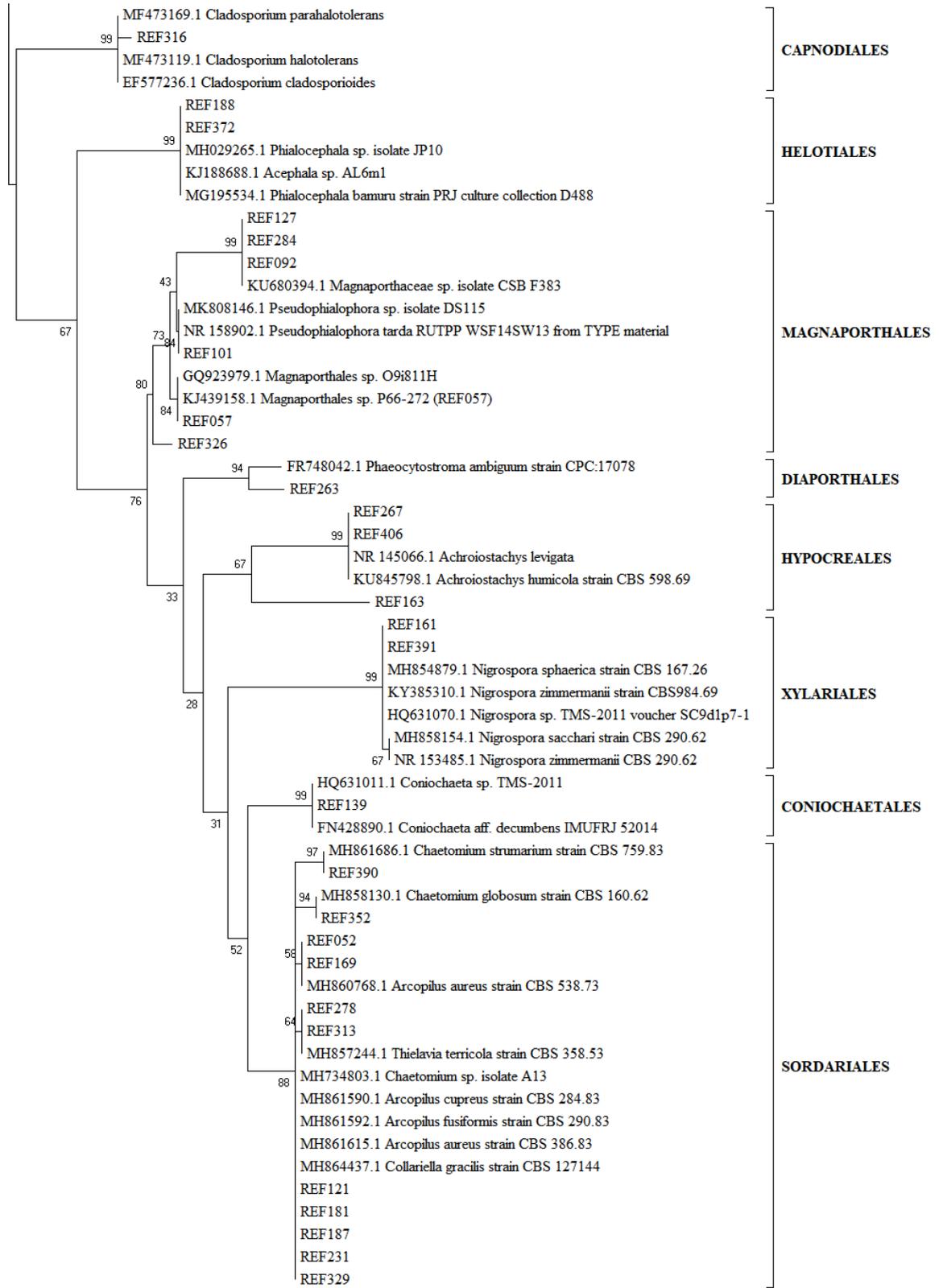


Figura 24. Análise de Máxima Verossimilhança com sequências da região ITS de isolados de endófitos radiculares isolados de cana-de-açúcar RB966928 agrupados em Ascomycota (exceto gêneros *Trichoderma* e *Fusarium*) e sequências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000.

Continuação Figura 24



0.050

4.5.3 Filo Basidiomycota

Dos isolados identificados, 47 pertenceram (15%) ao filo Basidiomycota (Tabela 10). Os mesmos, distribuíram-se em duas classes, Agaricomycetes (Subfilo Agaricomycotina) e Atractiellomycetes (Subfilo Pucciniomycotina), representadas por 46 e um isolado, respectivamente. Entre os 46 isolados de Agaricomycetes foram verificadas quatro ordens (Agaricales, Cantharellales, Hymenochaetales e Polyporales), sendo que Agaricales e Hymenochaetales apresentaram o maior número de isolados, com 22 e 18 isolados cada, respectivamente. Por outro lado, Cantharellales e Polyporales estiveram representadas por apenas cinco e um isolado cada, respectivamente (Figura 25; Tabela 11).

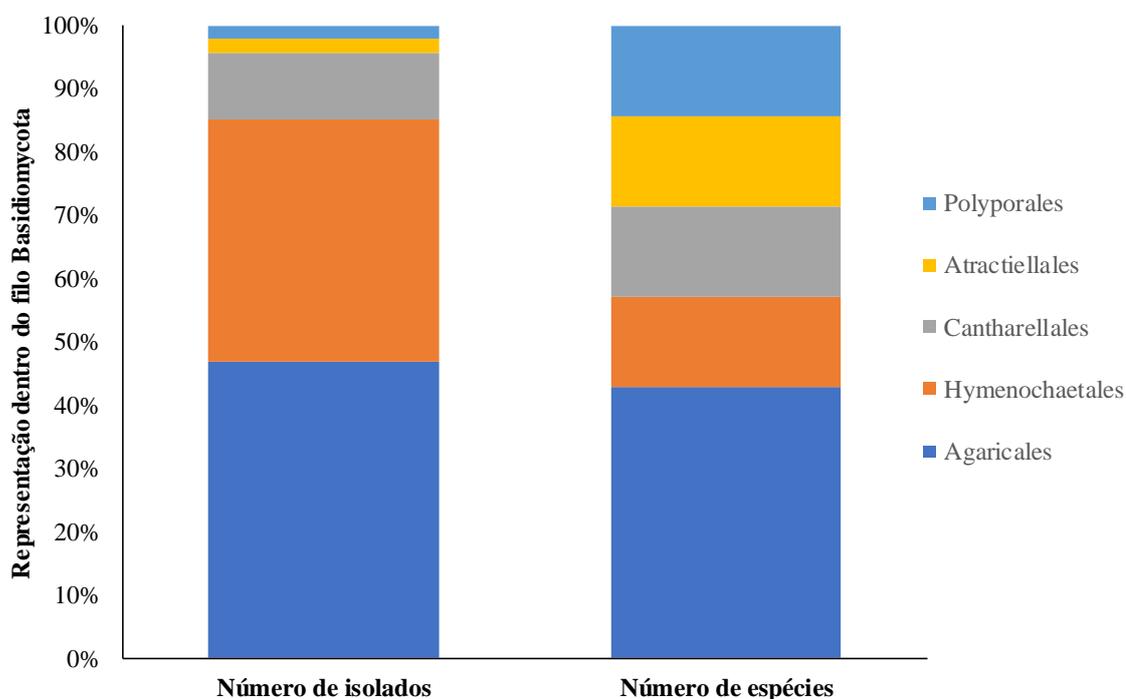


Figura 25. Percentagem de ordens do filo Basidiomycota em relação ao total de isolados e espécies de fungos endófitos radiculares isolados de cana-de-açúcar RB966928 cultivada no estado de São Paulo, Brasil.

A análise de máxima verossimilhança diferenciou os isolados de basidiomicetos em sete grupos (espécies) (Figura 26). Nenhuma das espécies verificadas dentro deste filo foi classificada como dominante ou muito comum, estando o mesmo representado apenas por espécies nas categorias de comum e rara. *Resinicium saccharicola* (Hymenochaetales) destacou-se por apresentar os maiores valores de frequência relativa (4,6%) e de ocorrência (29,2%), sendo considerada uma espécie comum. Os isolados identificados dentro da ordem Cantharellales formaram apenas um grupo, com afinidade pela família Ceratobasidiaceae. Aparentemente pertencem a uma mesma espécie de *Rhizoctonia* (anamorfo) ou seu respectivo teleomorfo, *Ceratobasidium*. O grupo apresentou o segundo maior valor de frequência de ocorrência entre os basidiomicetos (16,7%) estando presente em quatro das localidades de amostragem.

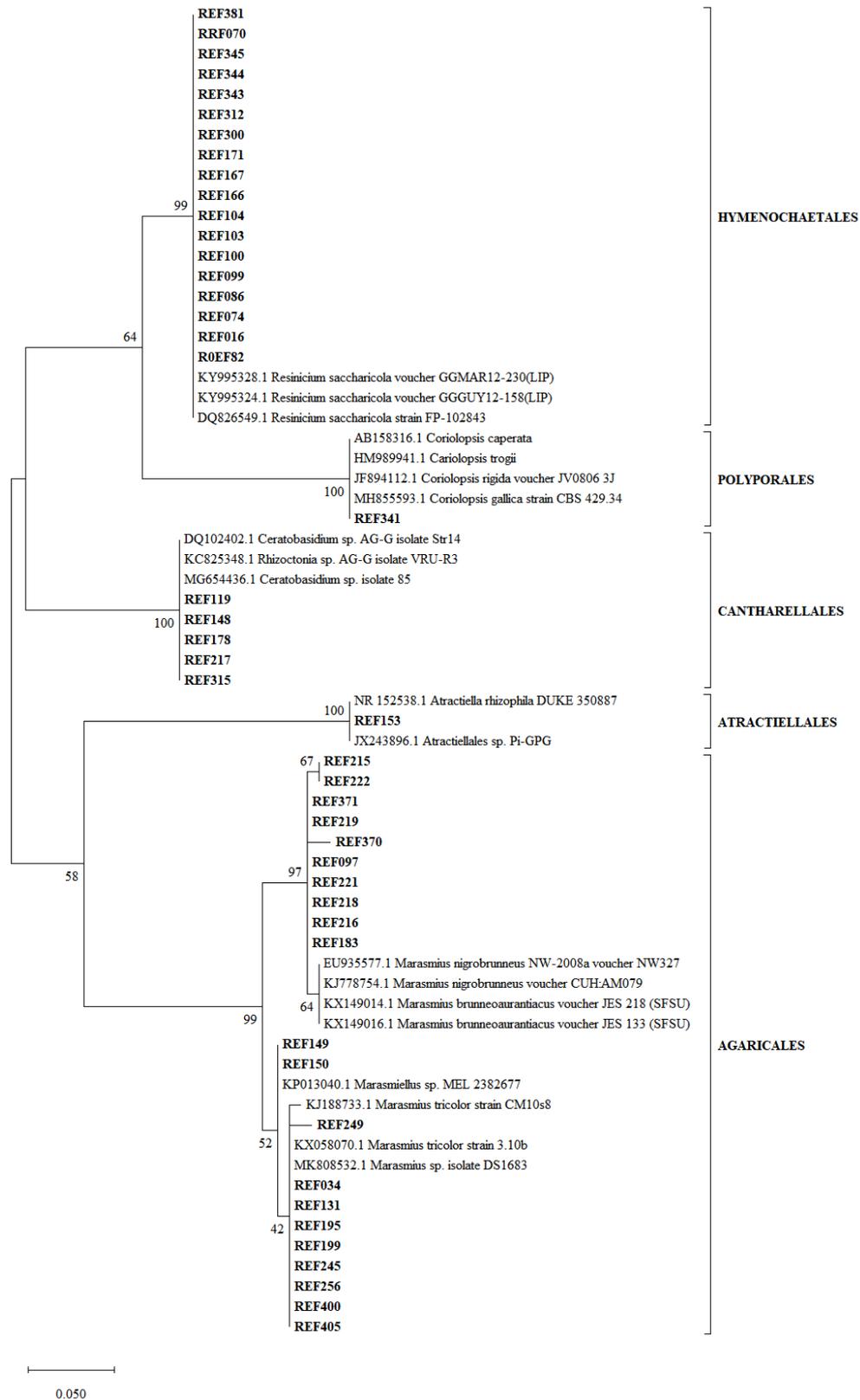


Figura 26. Análise de Máxima Verossimilhança com seqüências da região ITS de isolados de endófitos radiculares isolados de cana-de-açúcar RB966928 agrupados em Basidiomycota e seqüências similares depositadas no GenBank. Números nas ramas indicam a porcentagem de árvores nas quais os táxons associaram-se, considerando um *bootstrap* de 1000.

A ordem Agaricales diferenciou-se em três grupos, identificados todos apenas até ao nível de gênero, apresentando um deles afinidade pelo gênero *Marasmiellus* e os outros dois por *Marasmius*. Particularmente a espécie *Marasmius* sp. 2 foi a única espécie comum dentro da ordem Agaricales, com uma frequência de ocorrência de 12,5%. Esta espécie destacou-se por apresentar o segundo maior valor de frequência relativa dentro do filo Basidiomycota, sendo de 2,8% (11 isolados).

Algumas ordens estiveram representadas apenas por um isolado (*singletons*), sendo estas Atractiellales e Polyporales. No primeiro caso foi possível a identificação apenas até o nível de ordem (Atractiellales sp.) enquanto no segundo identificou-se afinidade do isolado correspondente com o gênero *Cariolopsis*.

4.6 DISCUSSÃO

Este trabalho contribui para aumentar o conhecimento sobre a microbiota fúngica associada endofiticamente às raízes da cana-de-açúcar. Existe atualmente maior concentração de estudos envolvendo comunidades de bactérias endofíticas associadas à cultura (e.g. Beneduzi et al., 2013; Muangthong et al., 2015), sendo escassos os estudos abordando a diversidade de endófitos fúngicos radiculares em plantas de cana. Destacam-se nesse sentido os trabalhos conduzidos por Mendes (2008), Romão-Dumaresq et al. (2016), Souza et al. (2016) e Sousa (2017).

Um denominador comum entre comunidades de fungos endofíticos radiculares associadas a diversos hospedeiros vegetais e ecossistemas é a predominância de ascomicetos, em detrimento de outros filos como Basidiomycota e Zygomycota (Fernandes et al., 2015; González-Teuber et al., 2017; Tadych & White, 2019). Adicionalmente há uma tendência a estas comunidades estarem dominadas por uma ou poucas espécies, existindo assim maior número de espécies raras (Sánchez Márquez et al., 2012; Tadych & White, 2019). Ambos padrões foram confirmados no presente trabalho, onde 85% dos isolados foram fungos ascomicetos, e apenas 4% das espécies foram classificadas como dominantes.

Não existe atualmente um consenso sobre a ordem de importância dos fatores reguladores da diversidade microbiana associada às plantas. Enquanto os resultados de algumas pesquisas atribuem maior valor ao genótipo vegetal (Bazghaleh et al., 2015) ou até mesmo a variações na fisiologia do hospedeiro em função, por exemplo, da idade da planta (Schlemper et al., 2018); outros, sugerem que as características químico-físicas do solo têm maior importância nessa seleção (Bokati et al., 2016). No caso da cana-de-açúcar, Romão-Dumaresq et al. (2016) verificaram efeito significativo do estágio de crescimento vegetal sobre a comunidade de fungos associada a raízes de duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas no estado de São Paulo, Brasil. De acordo com os autores, fatores como genótipo vegetal e manejo da cultura não interferem na comunidade. Resultados similares foram verificados por Mendes (2008) também para a cana-de-açúcar. No presente trabalho, as características químicas do solo não permitiram explicar a variação de espécies de fungos endofíticos radiculares associados às raízes da cana-de-açúcar RB966928. Isto pode indicar que outros fatores podem estar influenciando a ocorrência das espécies na comunidade desta variedade, por exemplo, o microclima e o manejo da lavoura. Embora o interesse e as pesquisas envolvendo a ecologia e composição das comunidades endofíticas estejam crescendo nos últimos anos, há ainda pouco entendimento dos fatores envolvidos devido, principalmente, às limitações metodológicas (Dissanayake et al., 2018).

Como verificado na curva de acumulação de espécies, a amostragem não foi suficiente para detectar a totalidade estimada da riqueza de espécies de fungos endofíticos radiculares da cana RB966928. De acordo com MacKenzie et al. (2018), a presença de uma espécie pode ser facilmente confirmada, porém é praticamente impossível afirmar a sua ausência, sendo que a não detecção de uma espécie pode se dar pela sua falta efetiva ou por deficiências do método para detectá-la durante um levantamento. Dissanayake et al. (2018) estudaram a diversidade de endófitos fúngicos em plantas de *Vitis vinifera* (Videira) com 3, 8 e 13 anos de idade, usando métodos dependentes e independentes de cultura. De acordo com os autores, a idade da planta foi determinante na riqueza das espécies, sendo este índice maior nas plantas mais velhas. Em relação aos métodos utilizados, os resultados obtidos por estes autores apontaram maior riqueza de espécies quando utilizada a abordagem independente de cultura (59 OTUs) em detrimento daquela dependente de cultura (28 espécies), havendo sobreposição de apenas 53% dos gêneros fúngicos identificados.

A maioria dos táxons verificados no presente trabalho tem sido previamente reportado fazendo parte das comunidades fúngicas associadas tanto a cana-de-açúcar quanto a outros

hospedeiros vegetais. Alguns deles são reconhecidos por seu efeito benéfico para as plantas que colonizam. Porém, a ocorrência de endófitos assintomáticos originalmente descritos como saprofitos ou patogênicos, como foi verificado no presente estudo, também já foi previamente reportada em outros estudos (e.g. Ferreira et al., 2017; Sousa, 2017; Dissanayake et al., 2018).

A ordem Hypocreales, representada aqui principalmente pelos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma*, teve algumas das espécies com maiores frequências relativas e de ocorrência na comunidade endofítica em estudo. O primeiro destes gêneros inclui principalmente fungos de fisiologia nutricional parasítica e saprofítica, sendo o caráter endofítico considerado por alguns autores apenas uma fase transitória das espécies de *Fusarium* (Bacon & Yates, 2006). O gênero apresenta uma distribuição mundial, e os complexos de espécies *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. fujikuroi* incluem importantes patógenos vegetais, podendo afetar também, porém em menor medida, animais e humanos, seja por infecção ou liberação de micotoxinas (Askun, 2018). Não obstante, são crescentes os relatos de espécies de *Fusarium* como fungos endofíticos isolados de tecidos saudáveis de diversas espécies vegetais (Vega et al., 2010; Impullitti & Malvick, 2013; Fernandes et al., 2015; Ferreira et al., 2017). De acordo com Bacon & Yates (2006) os integrantes deste gênero devem ser considerados hemibiotróficos. Ou seja, infetam os tecidos vegetais vivos como biotróficos, e após um determinado período de latência levam à morte do tecido ocupado, passando a ser saprofitos. Fatores relativos à fisiologia do hospedeiro vegetal e ao ambiente podem determinar o momento no qual a transição acontece.

Um estudo publicado por Lofgren et al. (2018) sugere relação evolutiva positiva entre gramíneas nativas e endófitos do gênero *Fusarium*, interação que estaria ausente no caso de variedades comerciais de culturas agrícolas introduzidas. Conforme os resultados referidos pelos autores, a liberação de micotoxinas do tipo tricotecenos por parte dos fungos é várias vezes menor em plantas nativas do que em plantas de trigo comercial infetadas por isolados de *Fusarium*. Por outro lado, de acordo com Bacon & Yates (2006), o desenvolvimento de variedades com maior resistência a patógenos como parte de programas de melhoramento vegetal, poderia explicar a ocorrência de interações assintomáticas entre algumas culturas agrícolas e espécies de *Fusarium* tipicamente patogênicas. Um exemplo disso é *F. verticillioides* e a sua dupla condição de patógeno e endófito de plantas milho (Bacon et al., 2008).

No caso da cana-de-açúcar o gênero *Fusarium* é responsável por algumas das principais doenças associadas à cultura. A espécie *F. moniliforme* é considerada o principal causante da fusariose que causa podridão de raízes e colmo, sistema radicular pouco desenvolvido e enfezamento dos brotos, e nas folhas, o sintoma conhecido como “pokkah boeng” (do javanês, literalmente, topo danificado), que é uma deformação e clorose na base de folhas novas, deixando o topo da cana semelhante a um cartucho distorcido com folhas cloróticas curtas e estrias avermelhadas (Matsuoka, 2012; Huang, 2018). Outras espécies como *F. sacchari* e *F. proliferatum* também têm sido reportadas recentemente como agentes causantes, não apenas da fusariose, mas também da podridão vermelha do colmo (Viswanathan et al., 2017; Dela Cueva et al., 2019). No México, espécies como *F. andiyazi*, *F. nygamai*, *F. sacchari*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* e *F. solani* foram isoladas a partir de raízes necrosadas de plantas de cana amostradas diretamente no campo (Martínez-Fernández et al., 2015).

Espécies de *Fusarium* têm sido verificadas também como endófitos da cultura. Em um estudo realizado por Sousa (2017) envolvendo fungos endofíticos foliares e radiculares de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, Brasil, aproximadamente 34% dos fungos isolados foram classificados como pertencentes a sete espécies do gênero, sendo *F. brachygibbosum* e *F. oxysporum* as espécies com maior frequência relativa, com valores de 20% e 6%, respectivamente. Outras espécies identificadas incluíram *F. begoniae*, *F. dlamini*, *F. lactis*, *F. sacchari* e *F. solani*. Em outro estudo, Romão-Dumaresq et al. (2016) avaliaram a diversidade

de fungos endofíticos radiculares e rizosféricos de duas variedades de cana, sendo *Fusarium* o segundo gênero melhor representado em relação ao número de isolados, mostrando afinidade pelas espécies *F. oxysporum*, *F. acutatum*, *F. solani*, *F. dlamini* e *F. moniliforme*. Também em plantações canavieiras do estado de São Paulo, Mendes (2008) verificou a ocorrência do gênero *Fusarium* como endófito de folhas e raízes da cultura, com destaque para *F. moniliforme* por apresentar elevada frequência de isolamento.

O gênero *Trichoderma* representado no presente estudo por espécies como *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. harzianum* e *T. virens*, além de duas espécies não identificadas, constitui um dos grupos fúngicos mais estudados quanto à sua aplicação agrícola, industrial e até clínica (Mukherjee et al., 2013). Espécies deste gênero são comumente isoladas a partir de amostras de solo e restos vegetais em decomposição (Atanasova et al., 2013; Kepler et al., 2017). Porém, de acordo com Atanasova et al. (2013), os fungos deste grupo têm a capacidade de transitar entre biotróficos e saprofitos, o qual explica a sua ocorrência como endófitos de diversas espécies vegetais, incluindo algumas de interesse agrícola como *Coffea arabica* (Mulaw et al., 2013) e *Glycine max* (Russo et al., 2016), entre outras. Estudos prévios envolvendo fungos endofíticos e rizosféricos de cana-de-açúcar também têm reportado a ocorrência de espécies de *Trichoderma* associadas à cultura (Mendes, 2008; Romão-Dumaresq et al., 2016; Sousa, 2017). Particularmente, Sousa (2017) destacou a ocorrência das espécies *T. afroharzianum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme* e *T. virens* como endófitos radiculares de cana.

A capacidade de algumas espécies e linhagens de *Trichoderma* em promover o crescimento vegetal tem sido amplamente documentada (Singh et al., 2014; Stewart & Hill, 2014; Park et al., 2019). Entre os mecanismos por meio dos quais isto ocorre destaca-se a capacidade de controle biológico, seja por hiperparasitismo de fungos patogênicos, competição direta de sítios de colonização do hospedeiro, antibiose ou indução de resistência sistêmica no hospedeiro vegetal (Harman et al., 2004; Park et al., 2019). Outros estudos apontam a produção de fitohormônios, como ácido indolacético, e a solubilização de fosfato como outras das formas dos integrantes deste gênero de promover o crescimento vegetal (Bader et al., 2019).

Pleosporales é considerada uma das principais ordens dentro da classe Dothideomycetes, integrada por espécies com hábitos saprofitos, parasíticos, patogênicos, epifíticos e endofíticos (Taylor et al., 2015). Os fungos desta ordem são comumente reportados como integrantes das comunidades endofíticas de diversos hospedeiros vegetais (Mandyam et al., 2010; Knapp et al., 2012; Fernandes et al., 2015) incluindo a cana-de-açúcar (Mendes, 2008; Romão-Dumaresq et al., 2016; Souza, De et al., 2016).

A espécie *Periconia macrospinoso* é considerada um dos endófitos septados escuros (DSE - *dark septate endophytes*) mais abundantes mundialmente, principalmente associada a gramíneas (Grünig et al., 2011). Uma série de trabalhos conduzidos nos últimos anos sugere que o efeito da inoculação com *P. macrospinoso* oscila no contínuo mutualismo – parasitismo, com resultados variáveis em função do hospedeiro vegetal e isolado fúngico (Mandyam et al., 2013; Mandyam & Jumpponen, 2015). Os elevados valores de frequências relativa e de ocorrência verificados para esta espécie no presente estudo, sugerem uma importante função desta interação para a cana de açúcar, ou pelo menos para a variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo. Porém, não existem registros de *P. macrospinoso* como endófito radicular da cana-de-açúcar, tendo sido previamente isolada apenas a partir de amostras de folha e colmo em decomposição, sendo considerados potenciais fungos saprofitos para a cultura (Shrestha et al., 2011). De acordo com Sánchez Márquez et al. (2012) algumas espécies podem alternar entre hábitos saprofitos, coprófilos, patogênicos e endofíticos.

Por outro lado, o gênero *Curvularia* compreende reconhecidos patógenos de culturas de importância econômica (Gao et al., 2014; Kusai et al., 2016; Liang et al., 2018). Porém, o gênero também é integrante comum das comunidades de fungos rizosféricos e endofitos radiculares (Mandyam et al., 2010; Loro et al., 2012). Alguns estudos têm inclusive

comprovado o seu efeito benéfico na promoção do crescimento vegetal por meio da solubilização de fosfatos e produção de fito-hormônios (Priyadharsini & Muthukumar, 2017b) ou metabólitos secundários com capacidade antimicrobiana (Tayung et al., 2012; Kaaniche et al., 2019). Mendes (2008) e Romão-Dumaresq et al. (2016) reportaram ocorrência deste gênero como endofítico e rizosférico na variedade transgênica de cana IMI-1 e sua respectiva variedade parental convencional SP80-1842. Por outro lado, *Curvularia* encontra-se entre os principais gêneros de fungos associados a sementes (cariopses) de cana-de-açúcar (Martins et al., 2009), o qual juntamente com a ocorrência deste gênero fúngico como endófito radicular da cultura, pode ser considerado um indicador de transmissão vertical de *Curvularia* spp. Essa transmissão vertical já foi verificada em plantas dos gêneros *Brachiaria*, *Crotalaria* e *Panicum*, onde a transmissão de *Curvularia* spp. entre sementes e plântulas atingiu valores de até 90% (Santos et al., 2014). Um estudo similar envolvendo sementes e plântulas de sorgo também reafirmou a transmissão vertical de diversos fungos potencialmente patogênicos, incluindo *C. alcornii*, *C. intermedia* e *C. lunata* (Stokholm et al., 2016). A importância ecológica da transmissão vertical de fungos potencialmente patogênicos não está ainda totalmente dilucidada. Porém, de acordo com Medina et al. (2009), do ponto de vista epidemiológico e fitossanitário esta associação pode ser considerada uma garantia de continuidade do ciclo de vida de fungos potencialmente patogênicos.

A ordem Eurotiales foi representada no presente trabalho pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*. Enquanto os relatos de *Aspergillus* e *Penicillium* como fungos endofíticos são abundantes (Shankar Naik et al., 2008; Vega et al., 2010; Mohamed Mahmoud et al., 2017), a ocorrência de *Talaromyces* é documentada com menos frequência. Não obstante, pesquisas recentes relatam o caráter endofítico de *Talaromyces* spp., com destaque para a produção e respectiva aplicação biotecnológica de metabólitos secundários por parte destes fungos (Vinale et al., 2017; Su & Niu, 2018). No caso da cana-de-açúcar, já existem relatos da ocorrência destes gêneros como integrantes das comunidades rizosféricas e endofíticas associadas à cultura (Mendes, 2008; Romão-Dumaresq et al., 2016; Sousa, 2017). Adicionalmente, Ramos et al. (2018) avaliaram a ocorrência, especificamente, dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* em solos tipicamente utilizados na cultura canavieira no estado de Pernambuco, Brasil. Os autores verificaram a ocorrência de espécies como *P. javanicum*, *P. limosum*, *P. paxilii*, *P. rubens*, *P. sanshaense*, *T. muroiie* e *T. verruculosus*. Considerando que o solo representa uma das principais fontes de endófitos radiculares (Sánchez-Cañizares, 2017), justifica-se a ocorrência de espécies destes gêneros também no interior das raízes de cana, conforme foi constatado no presente trabalho. Segundo Souza et al. (2016) fungos e bactérias presentes no solo invadem as plantas de cana-de-açúcar em estágios iniciais do desenvolvimento, dando origem a microbiota que logo se distribui de forma diferenciada entre os órgãos vegetais.

O gênero *Aspergillus* foi representado no presente estudo apenas por uma espécie com elevada verossimilhança por *A. novoparasiticus*. A mesma, é uma espécie relativamente nova, originalmente isolada de ambientes clínicos (Gonçalves et al., 2012). Porém, em estudo recente realizado no Brasil, Iamanaka et al. (2019) avaliaram a ocorrência de espécies de *Aspergillus* da seção Flavi em solos de canaviais, colmos e derivados da cadeia produtiva da cana-de-açúcar. De acordo com os autores, 84,5% dos isolados corresponderam à espécie *A. novoparasiticus*, estando presente em amostras de colmo e solo. O referido estudo representa o primeiro relato desta espécie em cana-de-açúcar e solos associados à produção da cultura. De forma similar, outros estudos têm destacado a ocorrência de *A. novoparasiticus* fora do ambiente hospitalar. Nesse sentido, no Brasil a referida espécie tem sido reportada associada a grãos de arroz e solo de áreas produtoras desta cultura (Katsurayama et al., 2018), assim como a grãos de milho (Viaro et al., 2017).

A ordem Sordariales foi representada no presente trabalho pelos gêneros *Arcopilus*, *Chaetonium* e *Pseudothielavia* (previamente identificado como *Thielavia*). Espécies de *Chaetonium*, embora não sejam exclusivamente endofíticas, têm sido amplamente documentadas como endófitos de diversas espécies vegetais, estando *C. globosum* entre as mais comumente isoladas (Fatima et al., 2016). No caso da cana-de-açúcar a ocorrência do gênero como integrante da comunidade endofítica e rizosférica foi previamente reportada por Romão-Dumaresq et al. (2016). De acordo com Zhou et al. (2016) *C. globosum* ao colonizar endofiticamente plantas de algodão as protege contra ataques de nematoides nas raízes e insetos na parte aérea, melhorando o desempenho vegetal. Por outro lado, Fatima et al. (2016) resume o potencial de *Chaetonium* spp. na produção de metabolitos secundários de importância biotecnológica para a indústria farmacêutica. Os gêneros *Arcopilus* e *Pseudothielavia* (antes dentro de *Thielavia*), por outro lado, são menos frequentemente documentados como endofíticos. Entre estes, apenas o gênero *Thielavia* tem sido previamente verificado como endófito radicular da cana-de-açúcar (Romão-Dumaresq et al., 2016), havendo também relatos da sua ocorrência como endófito de folhas e raízes de plantas de arroz (Su-Han et al., 2019). Já no caso de *Arcopilus*, Dwibedi & Saxena (2018) obtiveram isolados do gênero a partir do interior de tecidos sadios de folha e caule de plantas de uva.

Outros gêneros de ascomicetos verificados no presente trabalho como *Acephala* (Helotiales), *Cladosporium* (Capnodiales) e *Nigrospora* (Xylariales) têm sido previamente verificados fazendo parte da comunidade endofítica ou rizosférica de plantas de cana (Mendes, 2008; Romão-Dumaresq et al., 2016). Espécies de *Phialocephala* e *Acephala* são consideradas endófitos septados escuros. Especialmente, o complexo *P. fortinii* – *A. applanata* encontra-se entre os mais amplamente documentados, associado, principalmente, a coníferas e plantas da família Ericaceae em florestas da Europa e América do Norte (Grünig et al., 2008). A sua ocorrência não é comum em estudos envolvendo diversidade de endófitos no hemisfério sul. Já o gênero *Cladosporium* destaca-se pela sua ampla diversidade ecológica, com espécies de distribuição mundial, ocorrendo em praticamente qualquer substrato ou associadas a uma vasta gama de hospedeiros vegetais, já seja de forma biotrófica ou saprofítica, podendo atuar também como patógenos (Bensch et al., 2012; Bensch et al., 2015). Capacidade promotora do crescimento vegetal tem sido previamente reportada para isolados endofíticos do gênero, principalmente por meio da produção de compostos voláteis e metabólitos secundários capazes de inibir a proliferação de fungos fitopatogênicos (Paul & Park, 2013; Wang et al., 2013). Finalmente, o gênero *Nigrospora* é integrado por 27 espécies, entre as quais *N. sphaerica*, *N. oryzae* e *N. chinensis* são as mais comuns (Wang et al., 2017). A gama de hospedeiros vegetais com as quais os fungos do gênero interagem, seja como endofíticos, patogênicos ou saprofíticos, é ampla, incluindo a cana-de-açúcar, da qual os autores mencionam a ocorrência de *N. zimmermanii* em folhas da cultura amostradas no Brasil e no Equador. Por outro lado, Shrestha et al. (2011) verificaram a ocorrência do gênero associado a material vegetal de cana-de-açúcar, particularmente colmos e folhas em decomposição.

Ordens como Chaetothyriales, Diaporthales e Coniochaetales, estiveram representados por espécies raras, das quais, a exceção de *Coniochaeta* (Coniochaetales), não foram encontrados registros prévios de suas associações com cana-de-açúcar. *Rhinochadiella similis* (Chaetothyriales) foi relatada como endófito de outros hospedeiros vegetais como *Chenopodium quinoa* (González-Teuber et al., 2017), *Agriophyllum squarrosum* (Li et al., 2019) e *Acrostichum aureum* (Liu et al., 2019). Por outro lado, *Phaeocystostroma ambiguum* (Diaporthales) é reconhecido como o agente causador da podridão do colmo no milho (Lamprecht et al., 2011; Aguiar et al., 2016). Já o gênero *Coniochaeta* (Coniochaetales) é comumente encontrado associado a madeira em decomposição ou tecidos necrosados, havendo também relatos da sua ocorrência em tecidos sadios (Damm et al., 2010; Harrington et al., 2019) 2019). Particularmente, a espécie *Lecythophora decumbens*, atualmente classificada como

Coniochaeta decumbens (Khan et al., 2013), foi identificada por Shrestha et al. (2011) como integrante da comunidade de fungos decompositores de folhas e colmos de cana-de-açúcar em campo.

A ordem Magnaporthales é representada por aproximadamente 200 espécies, das quais em torno de 50% é constituído por fungos fitopatogênicos (Zhang et al., 2018). *Pseudophialophora tarda* foi recentemente descrita em associação com raízes de gramíneas (Luo et al., 2015). Porém, resultados apresentados por estes mesmos autores sugerem uma interação negativa para a planta quanto ao desenvolvimento de biomassa aérea e radicular.

Em relação ao filo Basidiomycota, isolados pertencentes a cinco ordens foram identificados, sendo estas Agaricales, Cantharellales, Hymenochaetales, Polyporales e Atractiellales. De acordo com Tadych & White (2019) as ordens Agaricales e Polyporales são comumente representadas nas comunidades endofíticas. Porém, alguns autores alertam sobre a possível subestimação da representatividade do filo em estudos de diversidade de endofíticos baseados em métodos dependentes de cultura (Vandenkoornhuys et al., 2002). Entretanto, vale destacar que o filo Basidiomycota é composto majormente por fungos saprofíticos, e em menor escala por necrotróficos, patogênicos e até micorrízicos (Baird et al., 2017).

A espécie *Resinicium saccharicola* (Hymenochaetales) foi a mais frequentemente isolada entre os basidiomicetos. De acordo com Nakasone (2000), a mesma pode ser encontrada associada a cana-de-açúcar, de onde foi originalmente isolada e descrita, assim como em outras gramíneas e caules de plantas herbáceas. Estudos recentes ratificam a ocorrência do gênero *Resinicium* como endófito da cana-de-açúcar (Romão-Dumaresq et al., 2016; Sousa, 2017). Sousa (2017) inclusive destacou a capacidade de fungos do gênero, previamente isolados de cana, de degradar xilana, pectina e amido a partir da produção *in vitro* das enzimas xilanase, poligalacturonase e amilase, respectivamente.

O segundo grupo com maior frequência de ocorrência entre os fungos identificados no filo Basidiomycota esteve representado pela família Ceratobasidaceae. Particularmente, os isolados que se agruparam nesta família formaram um único grupo com afinidade pelos gêneros *Rhizoctonia*, e o seu respectivo teleomorfo, *Ceratobasidium*. Uma análise de metadados desta família, incluindo sequências de DNA depositadas em bases de dados e as suas respectivas informações ecológicas, indicou que 50% das sequências avaliadas corresponderam a fungos patogênicos, 17,8% a micorrízicos de orquídeas, 3,1% a saprófitos e 3,2% a simbiontes ectomicorrízicos (Veldre et al., 2013). Nesse mesmo estudo, os autores reportaram tecidos vegetais danificados e raízes de orquídeas como as principais fontes de identificação das espécies de Ceratobasidaceae, representando 33,1 e 29,9% das sequências analisadas, respectivamente. Outras fontes de isolamento incluíram solo, raízes ectomicorrízicas e não micorrízicas, pontas radiculares e caules saudáveis. Isso indica uma ampla diversidade nutricional entre os integrantes da família Ceratobasidaceae. Particularmente, o gênero *Rhizoctonia* compreende patógenos vegetais causantes de grandes perdas em várias culturas de interesse agrícola, incluindo a cana-de-açúcar (Sheikh, 2016). Porém, outros tipos de interações simbióticas dos fungos dessa família não devem ser descartados, conforme discutido acima.

4.7 CONCLUSÕES

A variedade de cana-de-açúcar RB966928 apresenta uma comunidade de fungos endofíticos radiculares de elevada riqueza e diversidade de espécies, com predominância de ascomicetos, e espécies dos gêneros *Fusarium* e *Periconia*. A microbiota fúngica endofítica radicular caracteriza-se também pela presença de fungos potencialmente patogênicos e representantes de gêneros com comprovado potencial biotecnológico no controle biológico de outros microrganismos fitopatogênicos, particularmente do gênero *Trichoderma*.

Com base na ausência de significância estatística da análise de redundância, não há relação entre táxons de fungos endofíticos radiculares e as características químicas do solo rizosférico de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB966928.

Trezentos e noventa e um isolados de fungos endofíticos radiculares de variedade de cana-de-açúcar, derivados do presente trabalho, encontram-se atualmente depositados na Coleção de Fungos do Centro de Recursos Biológico Johanna Döbereiner, Embrapa Agrobiologia. Este importante acervo genético representa o ponto de partida para estudos futuros envolvendo a prospecção do potencial biotecnológico e da capacidade promotora do crescimento vegetal por parte destes fungos.

5 CAPÍTULO IV

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASSOCIADOS À RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR VARIEDADE RB966928 NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

5.1 RESUMO

A crescente demanda mundial por etanol aponta à expansão das monoculturas canavieiras no Brasil, com maior intenção de plantio nas regiões de Centro-Sul do país. O estado de São Paulo é o maior produtor da cultura, sendo a variedade RB966928 a mais plantada. Nas lavouras, as comunidades de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), pertencentes ao filo Glomeromycota, são de grande importância considerando os diversos serviços ecossistêmicos e nutricionais que oferecem. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo realizar um levantamento das espécies de FMAs e avaliar a colonização micorrízica em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 cultivadas no estado de São Paulo. Adicionalmente, visou verificar a possível relação entre a ocorrência de espécies de FMAs e as características químicas da fertilidade do solo. No total, 25 morfoespécies de FMAs foram identificadas, distribuídas em três ordens, oito famílias e 11 gêneros. Considerou-se elevado o número de espécies, particularmente porque foram oriundas da amostragem de uma única variedade de cana. Em relação ao nível de dominância das espécies, houve equilíbrio entre o número de espécies dominantes/muito comuns e comuns/raras. As espécies *Acaulospora mellea*, *A. scrobiculata*, *Glomus macrocarpum*, *G. microaggregatum*, *Racocetra persica* e *Sieverdingia tortuosa* foram classificadas como dominantes em relação à sua ocorrência. Foram verificados, em geral, baixas taxas de colonização radicular por FMAs (média = 18%) e por endófitos septados escuros (DSE) (média = 8%), porém correlacionados entre si, sugerindo sinergismo entre esses fungos e que as variáveis ambientais que influenciam a colonização agem conjuntamente em ambas as simbioses. A análise multivariada de redundância apontou influência do pH, H+Al, e teores de Al, K e P no solo sobre a ocorrência das espécies de FMAs. Houve correlação positiva entre os teores de glomalina e a maioria das características químicas de fertilidade do solo, exceto P disponível e pH, sugerindo benefício desta proteína na fertilidade dos solos.

Palavras-chave: Glomeromycota. Endófitos septados escuros. Rizosfera. Glomalina. Diversidade. *Saccharum* sp.

5.2 ABSTRACT

The growing global demand for ethanol points to the expansion of sugarcane monoculture in Brazil, with a greater planting intention in the Center-South regions of the country. The state of São Paulo is the main sugarcane producer, with the variety RB966928 being the most planted. In agricultural areas, the communities of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), within the phylum Glomeromycota, are of great importance considering the various ecosystem and nutritional services they offer. Thus, the present study aimed to carry out a survey of AMF species and to evaluate the mycorrhizal colonization in sugarcane plants of the variety RB966928 grown in the state of São Paulo. Additionally, aimed to verify possible relationships between the occurrence of AMF species and the chemical characteristics of soil fertility. In total, 25 morpho-species of AMF were identified, distributed in three orders, eight families and 11 genera. The number of species was considered high, particularly because just one sugarcane variety was sampled. Regarding the species dominance level, there was a balance between the number of dominant/very common species and that of common/rare ones. The species *Acaulospora mellea*, *A. scrobiculata*, *Glomus macrocarpum*, *G. microaggregatum*, *Racocetra persica* and *Sieverdingia tortuosa* were classified as dominant in relation to their occurrence. In general, low rates of root colonization by AMF (mean = 18%) and dark septate endophytes (DSE) (mean = 8%) were found, but correlated with each other, suggesting synergism between these fungi and that the environmental variables that influence colonization act together in both symbiosis. The multivariate redundancy analysis pointed out the influence of pH, H + Al and Al, K and P levels in the soil on the occurrence of AMF species. There was a positive correlation between the levels of glomalin and most of the chemical characteristics of soil fertility, except available P and pH, suggesting a benefit of this protein in soil fertility.

Key words: Glomeromycota. Dark septate endophytes. Rhizosphere. Glomalin. Diversity. *Saccharum* sp.

5.3 INTRODUÇÃO

A agricultura convencional e a monocultura têm se mostrado prejudiciais à conservação da biodiversidade do solo. Práticas agrícolas adotadas nesses sistemas, como aplicação excessiva de agrotóxicos, revolvimento da terra e uso de maquinarias pesadas que compactam o solo, são alguns dos elementos que reduzem a diversidade da microbiota edáfica e associada às plantas (Pupin et al., 2009; Smith et al., 2016; Malik et al., 2017). No caso da monocultura, o cenário torna-se ainda pior. A substituição de uma vegetação diversa e nativa, ou mesmo de uma pastagem consorciada, por apenas uma espécie vegetal traz consigo alterações na composição das comunidades microbianas do solo (Zhao et al., 2016; Huang et al., 2020).

Dentre os microrganismos do solo, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) oferecem uma variedade de serviços ecossistêmicos. Estes fungos, pertencentes ao filo Glomeromycota, compreendem atualmente em torno de 316 espécies mundialmente descritas, das quais 186 (59%) têm sido verificadas no hemisfério sul e 158 (50%) no território brasileiro (Cofré et al., 2019). Os FMAs caracterizam-se por estabelecer uma das simbioses mais importantes para as plantas: a micorriza arbuscular. A grande maioria das espécies vegetais associam-se a estes fungos, destinando parte do carbono fixado na fotossíntese à manutenção da referida simbiose (Stürmer & Siqueira, 2013). Em troca, os FMAs favorecem seus hospedeiros vegetais com aumentos do volume de solo explorado e da superfície de absorção de água e nutrientes, ao mesmo tempo que incrementam a tolerância das plantas a estresses bióticos (patógenos ou pragas) e abióticos (metais pesados, salinidade ou déficit hídrico) e modificam a fisiologia da planta aumentando, entre outros fatores, a fotossíntese e o influxo, transporte e acúmulo de nutrientes (Stürmer & Siqueira, 2013; Begum et al., 2019).

A interação planta – FMA não tem especificidade, porém níveis de preferência e eficiência simbiótica têm sido descritos nas diferentes combinações planta-isolado fúngico (Torrecillas et al., 2012; Fors et al., 2020). Desta forma, alterações na diversidade florística e uso do solo derivados da intervenção antrópica nos ecossistemas, são comumente relacionados a alterações nas comunidades de FMAs (Avio et al., 2013; Xu et al., 2017a). Plantações mono-específicas tendem a selecionar espécies generalistas com maior plasticidade ecológica, (Feldmann & Boyle, 1999; Oehl et al., 2003; Bennett et al., 2012), por norma geral compostas por espécies de esporulação abundante e baixa eficiência simbiótica (Carrenho et al., 2010).

No Brasil, a cana-de-açúcar representa uma das monoculturas mais extensivas, superada apenas pela soja e o milho. Ocupa uma área de mais de 10 milhões de hectares, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, responsável por 55% da área plantada com cana no país (IBGE, 2020). O plantio da variedade RB966928 abrange uma área de 630 mil hectares apenas nas regiões de Centro ao Sul do Brasil, sendo somente em São Paulo plantada em mais de 480 mil hectares (Braga Júnior et al., 2018). Estimam-se ainda aumentos na área ocupada pela cana nos próximos anos, principalmente para suprir a crescente demanda por etanol (Bordonal et al., 2018), com destaque para a variedade RB966928 (Braga Júnior et al., 2018). A menor “pegada de carbono” (índice que mede as emissões de gases de efeito estufa) do etanol o indica como uma excelente alternativa ao uso de combustíveis fósseis. Porém, o impacto ambiental da monocultura canavieira não deve ser ignorado, havendo, assim, necessidade de estudos que avaliem a diversidade da microbiota edáfica na condição de monocultura.

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi o de fazer levantamento das espécies de FMAs associadas à rizosfera e avaliar a colonização micorrízica e raízes da cana-de-açúcar variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo. O estudo visou também verificar possíveis relações entre a ocorrência das espécies de FMAs e as características de fertilidade do solo.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de cana amostradas para a avaliação da diversidade de endófitos radiculares no capítulo anterior, foram estudadas, no presente capítulo, quanto à diversidade e simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Para isso, amostras de solo e raízes finas foram aleatoriamente coletadas das touceiras de cana coletadas e analisadas. Posteriormente as touceiras coletadas foram transplantadas para vasos de 15 L usando como substrato o próprio solo coletado em campo para cada ponto de amostragem. Estas plantas foram cultivadas como culturas armadilhas de FMAs em casa de vegetação por 12 meses. Após esse período, amostras do solo rizosférico foram colhidas e analisadas conforme descrito a seguir.

Todas as análises envolvendo os FMAs foram feitas seguindo as metodologias compiladas por Novais et al. (2017). As amostras de raízes foram clarificadas e coloridas com azul de metila para visualização e quantificação da colonização por FMAs e fungos endofíticos septados escuros (DSE) em microscópio estereoscópico pelo método da placa quadriculada.

Amostras de 50 mL de solo rizosférico foram utilizadas para extração dos esporos de FMAs por peneiramento úmido e separação por flutuação em água e sacarose 45%. Os esporos separados foram quantificados e agrupados por aparência para identificação com base na sua morfologia. Para a identificação das espécies seguiram-se as descrições originais das mesmas, assim como informação mais atualizada disponível em páginas webs especializadas como a da Coleção Internacional de Cultivo de Fungos Micorrízicos (Vesículo) Arbusculares (INVAM, 2019) e da Coleção de Glomeromycota, *Endogone* e *Complexipes* do Departamento de Patologia Vegetal da Universidade de Agricultura de Szczecin, Polônia (ZUT, 2020).

Amostras de 1g de solo rizosférico (apenas aquele amostrado diretamente no campo) foram utilizadas para quantificar os teores de proteína do solo relacionada à glomalina (GSRP – *glomalin soil related protein*) total (T-GRSP) e facilmente extraível (EE-GRSP), conforme a metodologia Bradford (Novais et al., 2017).

A frequência de ocorrência (FO%) foi calculada a partir do número de amostras nas quais uma determinada espécie esteve presente em relação ao número total de amostras coletadas. O nível de dominância das espécies foi atribuído em função da frequência de ocorrência (FO%), conforme Zhang et al. (2004). Assim, as espécies foram classificadas em dominantes (FO>50%), muito comuns (30%<FO≤50%), comuns (10%<FO≤30%) e raras (FO≤10%). Usando o pacote Vegan (Okansen et al., 2019) do programa estatístico RStudio (R Core Team, 2018) foi construída uma curva de acumulação de espécies (1000 permutações livres / modelo aleatório) e realiza uma análise multivariada de redundância canônica (RDA) usando os dados de presença/ausência das espécies. As variáveis utilizadas na RDA foram selecionadas em função do fator de inflação da variância (VIF – *variance inflation factor*), sendo descartadas aquelas com VIF superior a 10 (Gardener, 2014; Borcard et al., 2018). A significância da RDA foi analisada por meio de teste de Permutações (n=999, p≤0,05). A contribuição independente de cada variável ao modelo da RDA foi igualmente submetida ao teste de Permutações (n=999, p≤0,05).

Foi também feita análise de correlação múltipla de Pearson (p≤0,05) para verificar possíveis relações entre riqueza de espécies, densidade de esporos, colonização por FMA e DSE, T-GRSP, EE-GRSP e características químicas do solo. Para isso utilizou-se o pacote PerformanceAnalytics (Peterson et al., 2019) do programa RStudio (R Core Team, 2018).

5.5 RESULTADOS

No total, 25 morfoespécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) foram identificadas a partir das amostras de solo rizosférico de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (Tabela 13). As espécies identificadas distribuíram-se em três ordens, oito famílias e 11 gêneros. A ordem que mais contribuiu com a riqueza de espécies foi Diversisporales com 16 espécies verificadas. Ao nível de família destacaram-se Acaulosporaceae e Glomeraceae com sete e seis espécies, respectivamente. Já os gêneros melhor representados foram *Glomus* e *Acaulospora*, com seis e cinco espécies, respectivamente. Os gêneros *Ambispora*, *Entrophospora*, *Kuklospora*, *Sieverdingia*, *Gigaspora* e *Scutellospora* estiveram representados por apenas uma espécie cada. A curva de acumulação de espécies teve uma tendência à estabilização indicando suficiência do esforço amostral para atingir a diversidade total de FMAs associada à referida variedade de cana (Figura 27).

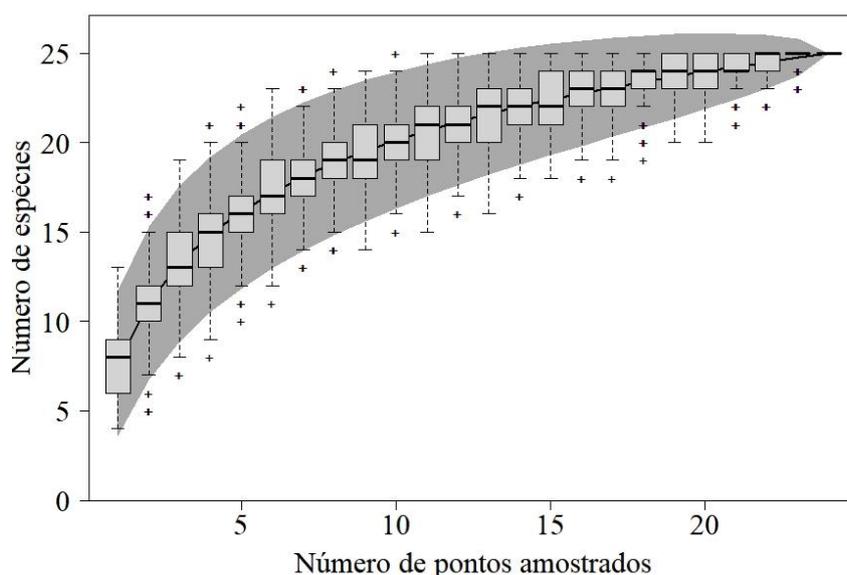


Figura 27. Curva de acumulação de espécies de fungos micorrízicos arbusculares associados à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo e amostrada entre maio e junho de 2017. Boxplots representam a variação estimada a partir de 1000 permutações aleatorizadas do número de espécies em função do esforço amostral, considerando um intervalo de confiança de 95% (sombra cinza).

Tabela 13. Lista de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (Filo Glomeromycota) associados à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB966928, cultivada no estado de São Paulo, Brasil.

Ordem/Família/Espécie segundo a base de dados MycoBank	Basiônimo
Archaeosporales C. Walker & A. Schüßler	
Ambisporaceae C. Walker, Vestberg & A. Schüssler	
<i>Ambispora leptoticha</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker, Vestberg & A. Schüssler (2006)	<i>Glomus leptotichum</i> N.C. Schenck & G.S. Sm. (1982)
Glomerales J.B. Morton & Benny	
Claroideoglomeraceae C. Walker & A. Schüßler	
<i>Claroideoglomus etunicatum</i> (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler (2010)	<i>Glomus etunicatum</i> W.N. Becker & Gerd. (1977)
<i>Claroideoglomus lamellosum</i> (Dalpé, Koske & Tews) C. Walker & A. Schüßler (2010)	<i>Glomus lamellosum</i> Dalpé, Koske & Tews (1992)
Glomeraceae Piroz. & Dalpé	
<i>Glomus clavisorum</i> (Trappe) R.T. Almeida & N.C. Schenck (1990)	<i>Sclerocystis clavisporea</i> Trappe (1977)
<i>Glomus formosanum</i> C.G. Wu & Z.C. Chen (1986)	<i>Glomus formosanum</i> C.G. Wu & Z.C. Chen (1986)
<i>Glomus glomerulatum</i> Sieverd. (1987)	<i>Glomus glomerulatum</i> Sieverd. (1987)
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & C. Tul. (1845)	<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & C. Tul. (1845)
<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & P.D. Olexia (1986) ¹	<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & P.D. Olexia (1986)
<i>Glomus</i> sp. (ornamentado)	<i>Glomus</i> sp. (ornamentado)
Diversisporales C. Walker & A. Schüßler	
Acaulosporaceae J.B. Morton & Benny	
<i>Acaulospora foveata</i> Trappe & Janos (1982)	<i>Acaulospora foveata</i> Trappe & Janos (1982)
<i>Acaulospora mellea</i> Spain & N.C. Schenck (1984)	<i>Acaulospora mellea</i> Spain & N.C. Schenck (1984)
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe (1977)	<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe (1977)
<i>Acaulospora tuberculata</i> Janos & Trappe (1982)	<i>Acaulospora tuberculata</i> Janos & Trappe (1982)

Ordem/Família/Espécie segundo a base de dados MycoBank	Basiônimo
<i>Acaulospora</i> sp.	<i>Acaulospora</i> sp.
<i>Entrophospora infrequens</i> (I.R. Hall) R.N. Ames & R.W. Schneid. (1979)	<i>Glomus infrequens</i> I.R. Hall (1977)
<i>Kuklospora colombiana</i> (Spain & N.C. Schenck) Oehl & Sieverd. (2006) ²	<i>Entrophospora colombiana</i> Spain & N.C. Schenck (1984)
Dentiscutataceae Sieverd., F.A. Souza & Oehl³	
<i>Dentiscutata cerradensis</i> (Spain & J. Miranda) Sieverd., F.A. Souza & Oehl (2009)	<i>Scutellospora cerradensis</i> Spain & J. Miranda (1996)
<i>Dentiscutata heterogama</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl (2009)	<i>Endogone heterogama</i> T.H. Nicolson & Gerd. (1968)
<i>Dentiscutata scutata</i> (C. Walker & Dieder.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl (2009) ⁴	<i>Scutellospora scutata</i> C. Walker & Dieder. (1989)
Diversisporaceae C. Walker & A. Schüßler	
<i>Sieverdingia tortuosa</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) Błaszk., Niezgodą & B.T. Goto (2019)	<i>Glomus tortuosum</i> N.C. Schenck & G.S. Sm. (1982)
Gigasporaceae Morton & Benny	
<i>Gigaspora</i> sp.	<i>Gigaspora</i> sp.
<i>Scutellospora</i> sp.	<i>Scutellospora</i> sp.
Racocetraceae Oehl, Sieverd. & F.A. Souza⁵	
<i>Racocetra coralloidea</i> (Trappe, Gerd. & I. Ho) Oehl, F.A. Souza & Sieverd. (2009) ⁶	<i>Gigaspora coralloidea</i> Trappe, Gerd. & I. Ho (1974)
<i>Racocetra fulgida</i> (Koske & C. Walker) Oehl, F.A. Souza & Sieverd. (2009) ⁷	<i>Scutellospora fulgida</i> Koske & C. Walker (1986)
<i>Racocetra persica</i> (Koske & C. Walker) Oehl, F.A. Souza & Sieverd. (2009) ⁸	<i>Gigaspora persica</i> Koske & C. Walker (1985)

Nomenclatura divergente do MycoBank aceita pela base de dados Index Fungorum: ¹*Rhizoglomus microaggregatum* (Koske, Gemma & P.D. Olexia) Sieverd., G.A. Silva & Oehl (2015); ²*Acaulospora colombiana* (Spain & N.C. Schenck) Kaonongbua, J.B. Morton & Bever (2010); ³Gigasporaceae Morton & Benny; ⁴*Scutellospora scutata* C. Walker & Dieder. (1989); ⁵Gigasporaceae Morton & Benny; ⁶*Scutellospora coralloidea* (Trappe, Gerd. & I. Ho) C. Walker & F.E. Sanders (1986); ⁷*Dentiscutata erythropus* (Koske & C. Walker) C. Walker & D. Redecker (2013); ⁸*Scutellospora persica* (Koske & C. Walker) C. Walker & F.E. Sanders (1986)

A riqueza de espécies oscilou entre quatro (Lavouras nos pontos de amostragens 3 – Macatuba e 21 – Presidente Epitácio) e 13 espécies (lavoura no ponto de amostragem 6 – João Ramalho) por ponto amostral (Tabela 14). Em relação ao nível de dominância das espécies, verificou-se uma comunidade equilibrada nos diferentes níveis de classificação, sendo sete espécies (28%) consideradas raras, nove espécies (36%) consideradas comuns e nove espécies (36%) muito comuns ou dominantes. Na figura 28 podem ser observadas microfotografias de esporos de algumas das espécies identificadas dentro de cada uma destas categorias.

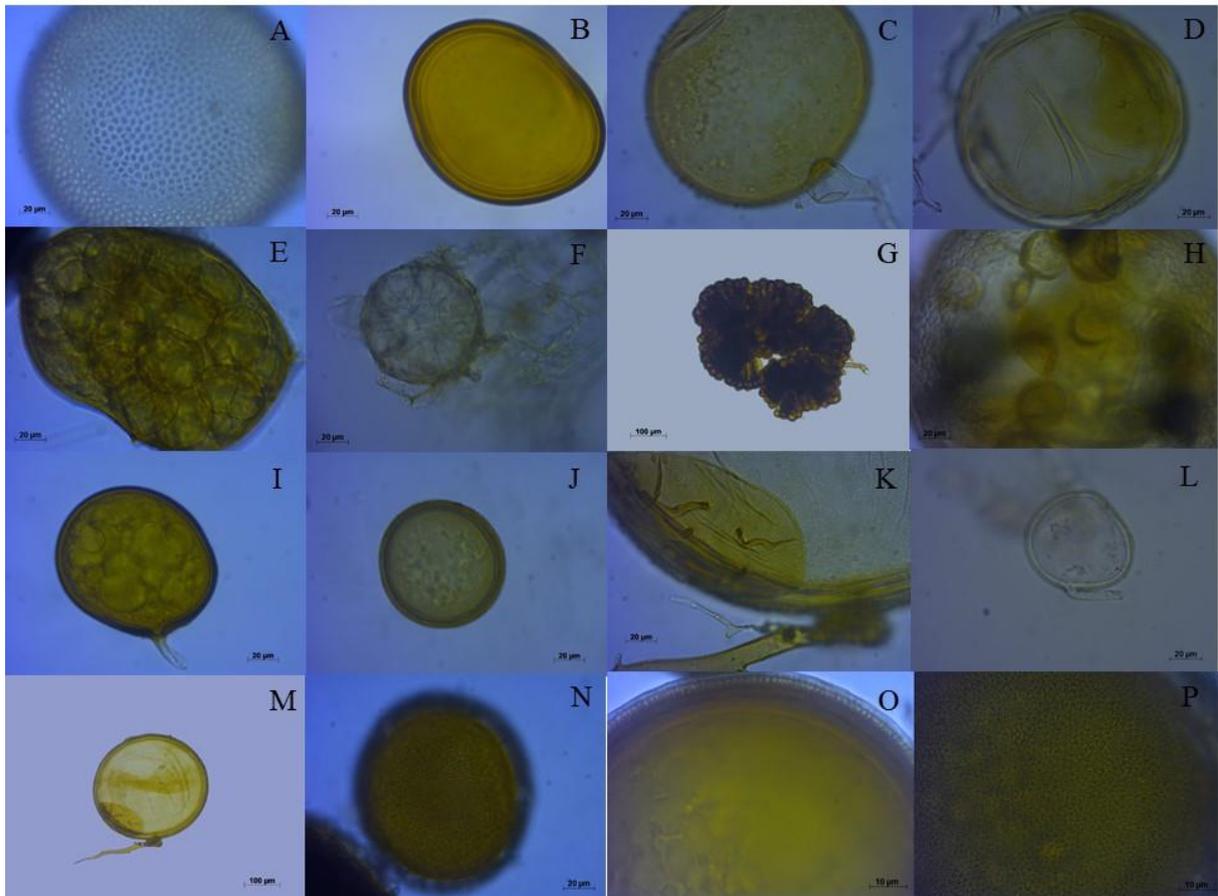


Figura 28. Esporos de algumas espécies de fungos micorrízicos arbusculares verificadas em plantações de cana-de-açúcar variedade RB966928 do estado de São Paulo e sua respectiva classificação quanto ao nível de dominância na comunidade. Dominantes: **A** *Acaulospora scrobiculata*, **B** *A. mellea*, **C-D** *Racocetra persica*, **E** *Glomus microaggregatum* ocupando espora de *R. persica*, **D** *Sieverdingia tortuosa*; Muito comuns: **G** *G. clavisporum*, **H** *Ambispora leptoticha* colonizado por *G. microaggregatum*; Comuns: **I** *Claroideoglomus etunicatum*, **J** *Kuklospora colombiana*, **K** *Dentiscutata scutata*, **L** *Claroideoglomus lamellosum*; Raras: **M** *D. cerradensis*; **N** *A. tuberculata*, **O-P** *Entrophospora infrequens*.

Tabela 14. Ocorrência no campo e/ou na cultura armadilha (+), frequência de ocorrência (FO%) e nível de dominância (Nível) de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) identificadas nos 24 pontos de amostragem de touceiras de cana-de-açúcar variedade RB966928 coletadas entre 26/05/2017 e 09/06/2017 em lavouras no estado de São Paulo, Brasil.

Espécie de FMA identificada	Fonte dos esporos	Pontos de amostragem																								FO%	Nível
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
<i>Ambispora leptoticha</i>	Campo	+	+					+	+			+		+		+	+									33,3	MC
	Cultura armadilha																+										
<i>Claroideoglossum etunicatum</i>	Cultura armadilha		+																	+	+					12,5	C
<i>Claroideoglossum lamellosum</i>	Campo		+											+												12,5	C
	Cultura armadilha				+																						
<i>Glomus clavisporum</i>	Campo					+	+	+	+	+	+	+		+			+						+			41,7	MC
<i>Glomus formosanum</i>	Cultura armadilha				+																					4,2	R
<i>Glomus glomerulatum</i>	Campo		+				+																			12,5	C
	Cultura armadilha																						+				
<i>Glomus macrocarpum</i>	Campo	+	+			+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	87,5	D
	Cultura armadilha		+		+		+	+			+			+		+		+	+	+	+						
<i>Glomus microaggregatum</i>	Campo			+	+	+	+			+	+	+		+					+							75,0	D
	Cultura armadilha		+							+	+			+	+		+	+	+	+	+			+			
<i>Glomus sp. (ornamentado)</i>	Cultura armadilha																			+						4,2	R
<i>Acaulospora foveata</i>	Campo				+	+	+	+								+		+	+	+			+	+	41,7	MC	
	Cultura armadilha																						+	+			
<i>Acaulospora mellea</i>	Campo				+	+		+					+		+	+	+			+	+	+	+	+	54,2	D	
	Cultura armadilha		+																								
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	Campo			+	+	+	+			+	+	+	+	+					+	+		+	+	+	75,0	D	
	Cultura armadilha				+						+				+		+		+	+	+	+	+	+			
<i>Acaulospora tuberculata</i>	Campo																			+					8,3	R	
	Cultura armadilha						+																				
<i>Acaulospora sp.</i>	Campo	+																							4,2	R	
<i>Entrophospora infrequens</i>	Campo						+																		4,2	R	

Espécie de FMA identificada	Fonte dos esporos	Pontos de amostragem																								FO%	Nível
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
<i>Kuklospora colombiana</i>	Campo			+								+		+												12,5	C
<i>Dentiscutata cerradensis</i>	Campo							+																		4,2	R
<i>Dentiscutata heterogama</i>	Campo	+																						+	12,5	C	
	Cultura armadilha																						+	+			
<i>Dentiscutata scutata</i>	Campo													+											25,0	C	
	Cultura armadilha							+							+					+	+			+			
<i>Sieverdingia tortuosa</i>	Campo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100,0	D	
	Cultura armadilha				+		+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+				+	+			
<i>Gigaspora</i> sp.	Campo					+			+	+															20,8	C	
	Cultura armadilha				+																			+			
<i>Scutellospora</i> sp.	Campo																							+	4,2	R	
<i>Racocetra coralloidea</i>	Campo	+												+											29,2	C	
	Cultura armadilha						+			+			+	+	+			+									
<i>Racocetra fulgida</i>	Campo					+									+		+		+		+				20,8	C	
<i>Racocetra persica</i>	Campo						+		+		+	+		+				+						+	62,5	D	
	Cultura armadilha				+			+	+	+	+		+	+				+	+	+				+			
Total de espécies		6	8	4	10	9	13	7	7	8	6	7	6	11	7	6	8	8	8	9	8	4	9	9	5		

FO: Frequência de ocorrência (%) representa o número de amostras na qual uma determinada espécie foi verificada em relação ao número total de amostras.
Nível de dominância: **D** - dominante, **MC**- muito comum, **C**- comum, **R**- rara (Zhang et al., 2004)

A densidade de esporos micorrízicos na rizosfera das plantas de cana amostradas variou entre 73 (ponto de amostragem 12 – Santa Lúcia) e 753 esporos (ponto de amostragem 1 – Barra Bonita) por cada 50 cm³ de solo, e foi em média de 244 esporos por cada 50 cm³ de solo (Tabela 15). Os níveis de EE-GRSP no solo oscilaram entre 0,25 (ponto de amostragem 6 – João Ramalho) e 0,91 mg g⁻¹ de solo (Ponto de amostragem 1 – Barra bonita), sendo em média de 0,55 mg g⁻¹. Já a T-GRSP foi em média de 3,86 mg g⁻¹, com uma grande variação entre a rizosfera das plantas amostradas, atingindo valores mínimos e máximos de 1,23 (Ponto de amostragem 6 – João Ramalho) e 12,07 mg g⁻¹ (Ponto de amostragem 23 – Ipaussu), respectivamente.

Tabela 15. Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e quantidade de proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (EE-GRSP) e total (T-GRSP) em amostras de solos rizosférico de plantas de cana-de-açúcar Variedade RB966928 amostradas entre maio e junho de 2017 em diferentes plantações do estado de São Paulo, Brasil.

Ponto de amostragem	Densidade de esporos em 50cm ³ de solo	mg g ⁻¹	
		EE-GRSP	T-GRSP
1	753	0,91	6,58
2	329	0,83	5,04
3	212	0,49	3,26
4	157	0,60	4,34
5	205	0,40	1,82
6	500	0,25	1,23
7	290	0,51	5,26
8	120	0,44	2,27
9	109	0,41	1,79
10	154	0,63	3,46
11	126	0,51	2,82
12	73	0,72	3,45
13	208	0,66	3,48
14	129	0,62	4,69
15	266	0,50	2,65
16	257	0,43	4,01
17	109	0,48	2,29
18	273	0,50	2,44
19	162	0,48	2,85
20	538	0,48	2,38
21	151	0,48	2,15
22	397	0,41	2,85
23	239	0,85	12,07
24	96	0,71	9,45
Média	244	0,55	3,86
Desvio padrão	163	0,16	2,50
Mínimo	73	0,25	1,23
Máximo	753	0,91	12,07

Pontos de amostragem conforme tabela 8, capítulo 3.

Verificou-se colonização por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e endófitos septados escuros (DSE) em todas as plantas amostradas. No caso dos fungos micorrízicos, a colonização na maioria das raízes caracterizou-se pela ocorrência de hifas cenocíticas e esporos glomoides que reagiram à coloração com azul de metila (Figura 29). Já no caso dos fungos DSE foram observados principalmente microescleródios melanizados ocupando o espaço radicular. A colonização por FMAs variou de 2% (Ponto de amostragem 6 – João Ramalho) a 49% (Ponto de amostragem 19 – Valparaiso), sendo em média de 17,8% (Figura 30). A colonização por FMAs foi, no geral, superior àquela por DSE, que variou de 1% (Pontos de amostragem 6 e 15,

João Ramalho e Igarapava, respectivamente) a 23% (Pontos de amostragem 10 e 18, Porto Ferreira e Barretos, respectivamente), sendo o valor médio de 7,8% (Figura 30). Porém, de modo geral, a colonização por ambos os grupos fúngicos foi baixa. A ocupação radicular por FMAs e DSE foi particularmente baixa nos pontos amostrais 6 e 15 (João Ramalho e Igarapava, respectivamente) e elevada nos pontos 10, 19 e 23 (Porto Ferreira, Valparaíso e Ipaussu) (Figura 30).

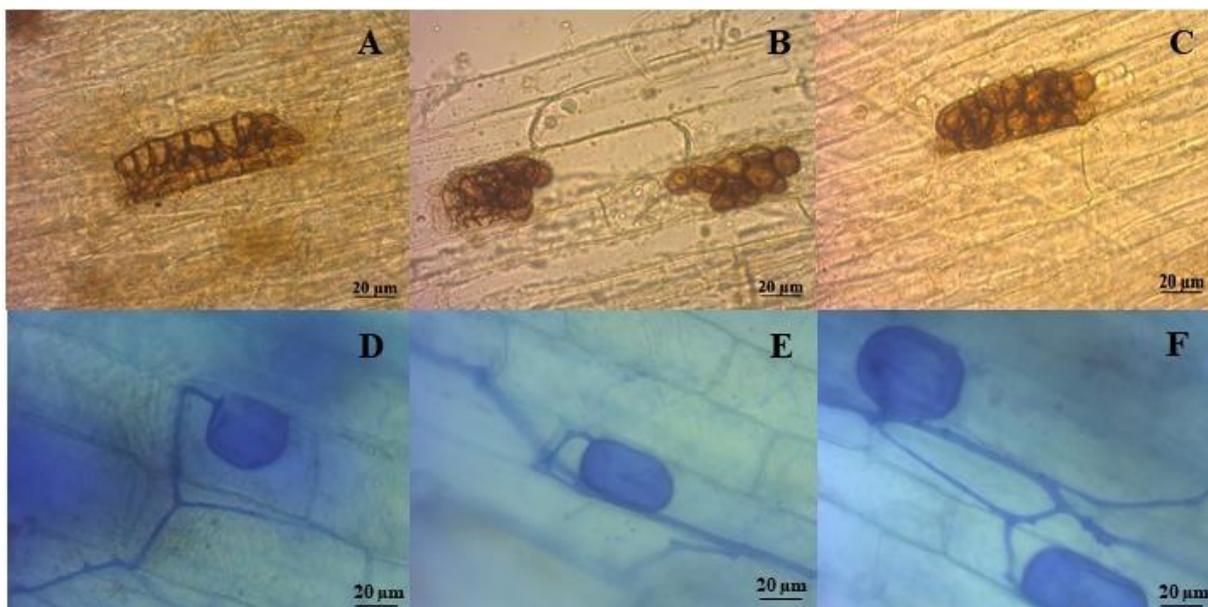


Figura 29. Colonização radicular por fungos endofíticos septados escuros (A-C) e por fungos micorrízicos arbusculares (D-F) em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 cultivada no estado de São Paulo, Brasil amostrada entre maio e junho de 2017.

A análise de correlação de Pearson indicou correlações significativas entre algumas das variáveis avaliadas (Figura 31). A colonização por FMAs apresentou correlação com a colonização por fungos DSE, sendo também significativa sua relação com os teores de T-GRSP, C, N, Ca e P. Os teores de T-GRSP e EE-GRSP foram positivamente correlacionados entre si, e ambos correlacionaram-se positivamente com os teores de C, N e elementos catiônicos do solo (Ca, H+Al, Mg e K) indicando relação da matéria orgânica e teor de GRSP com a troca de cátions que caracterizam o ambiente edáfico. O pH correlacionou-se de forma negativa com a acidez potencial (H+Al) e o teor de Al, não influenciando as características biológicas avaliadas como densidade de esporos, riqueza de espécies e colonização por FMAs ou DSE, e nem os teores de glomalina no solo.

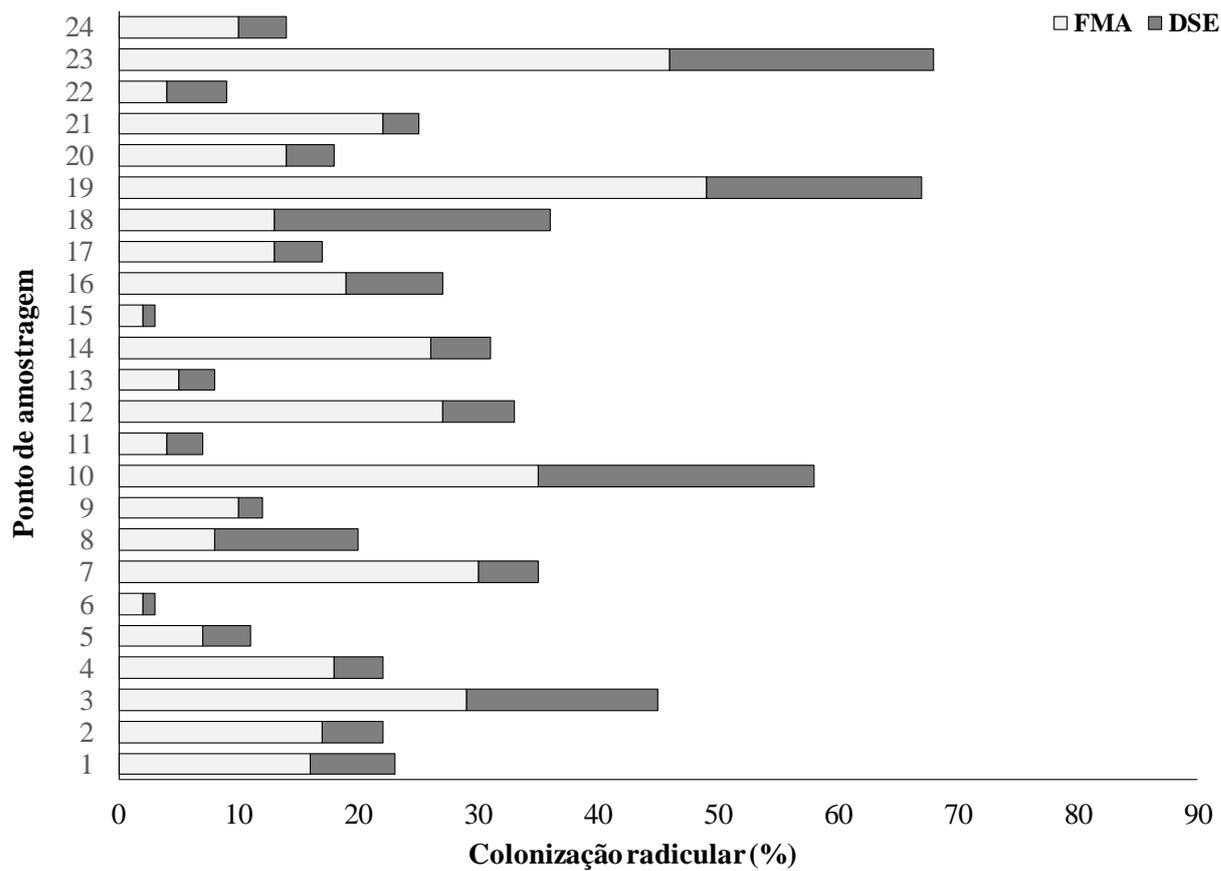


Figura 30. Colonização por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e endófitos septados escuros (DSE) em raízes de plantas de cana-de-açúcar variedade RB966928 coletadas em 24 pontos de amostragem no estado de São Paulo, Brasil entre maio e junho de 2017.

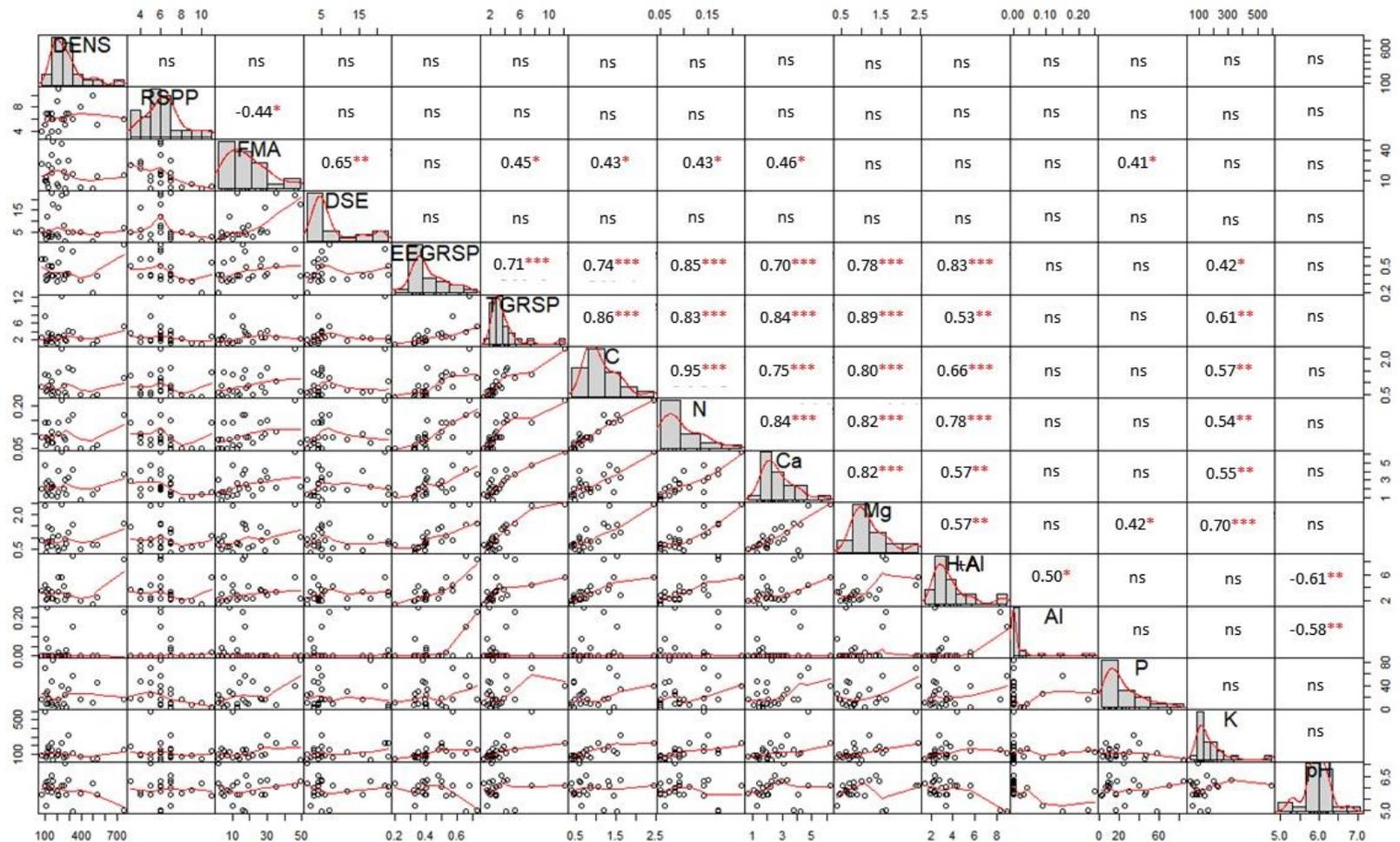


Figura 31. Matriz de correlação de Pearson. Na diagonal a distribuição de cada variável, embaixo da diagonal os gráficos de dispersão bivariada e acima os valores do coeficiente de correlação com a respectiva indicação de significância (“***” $p \leq 0,001$; “**” $p \leq 0,01$; “*” $p \leq 0,05$, “ns” não significativo). DENS: densidade de esporos de FMAs; RSPP: riqueza de espécies de FMAs; FMA: colonização por FMAs; DSE: colonização por DSE; EEGRSP: fração facilmente extraível de proteína do solo relacionada à glomalina; TGRSP: fração total de proteína do solo relacionada à glomalina. C, N, Ca, H+Al, Mg, P, K representam os teores destes elementos nas análises de fertilidade dos solos; pH: potencial hidrogeniônico do solo.

R. coralloidea e *K. colombiana* predominaram em áreas com teores de P inferiores a 25 mg/L, sugerindo a preferência delas por ambientes com teores de P mais baixos.

A ocorrência das espécies *A. foveata* e *D. scutata* esteve associada a maiores valores de pH do solo, enquanto a espécie *Acaulospora* sp. mostrou preferência por solos com pH mais ácido. Esta última espécie foi também influenciada pelo teor de K no solo. Embora se trate de uma espécie rara, a sua presença pareceria estar associada a valores elevados deste nutriente. Finalmente, a ocorrência de *Am. leptoticha* foi relacionada à concentração de Al no solo.

A espécie *S. tortuosa* ocupou a posição central da representação gráfica da análise de RDA, não estando relacionada de forma particular com nenhuma das variáveis ambientais incluídas na análise. Isso explica a sua frequência de ocorrência de 100%, ou seja, a sua presença em todos os solos amostrados. Desta forma, a espécie mostrou-se altamente adaptada à cultura da cana, com elevada plasticidade quanto as características químicas do solo.

5.6 DISCUSSÃO

Estudos de levantamento de espécies, principalmente quando baseados na observação da presença como é o caso da identificação morfológica dos FMAs, comumente não atingem o total de espécies presentes no ambiente (Silva et al., 2014; Vieira et al., 2019). A identificação de espécies de FMAs com base na morfologia dos esporos apresenta a limitação de ser dependente da sua ocorrência no solo no momento da amostragem. A sazonalidade na esporulação de FMAs tem sido documentada por diversos autores (Pringle & Bever, 2002; Oehl et al., 2009; Reyes et al., 2019). Assim, estudos de ocorrência destes fungos são mais robustos quando incluídas mais de uma época de amostragem e culturas armadilhas, sendo apenas esse último recurso aplicado no presente estudo. Porém, a combinação de amostras de campo e culturas armadilhas mostrou-se eficiente no levantamento de espécies, conforme indicado pela curva de acumulação.

Trabalhos de diversidade da maioria dos organismos resultam ser mais eficientes na detecção e diferenciação de espécies quando utilizadas técnicas moleculares do que técnicas morfológicas. No caso dos FMAs, essa diferença radica na capacidade de as técnicas moleculares estimarem a riqueza, não apenas com base na presença de esporos, e sim a partir de todas as partes fúngicas presentes no solo. Entretanto, os estudos moleculares de FMAs estão sendo desenvolvidos de forma extremamente lenta comparado a outros grupos de microorganismos. Isto se deve a inúmeros fatores limitantes desta técnica para esse grupo fúngico, como dificuldades de extração do seu DNA de dentro de plantas e solo (Patreze et al., 2019) e organização genômica com esporos multinucleados e hifas cenocíticas, podendo os núcleos serem geneticamente distintos, mas estarem em um mesmo micélio e ser trocado em anastomoses (Chagnon, 2014). Além disso, existe uma grande variação entre as linhagens de FMAs em relação aos principais marcadores genéticos disponíveis em bases de dados moleculares de fungos, o que impede a adoção de uma única região marcadora para todas as espécies em levantamentos de diversidade de FMAs (Patreze et al., 2019). O principal desafio para avaliar molecularmente a diversidade de FMAs é a definição de um marcador genético amplo para toda a diversidade de espécies do filo Glomeromycota (Patreze et al., 2019), desafio este que somente nos últimos anos começa a ser vencido, com dificuldades e sequenciamento de várias regiões ou de regiões muito amplas de marcadores. No Brasil, porém, devido a essas dificuldades supracitadas e ainda ao alto custo da análise molecular, prevalece o uso da identificação dos glomeromicetos com base na morfologia dos esporos como são os dados do presente capítulo.

Assim, baseado na morfologia dos esporos, a riqueza de espécies de FMAs registrada no presente trabalho, embora oriunda de uma única variedade de cana, é similar à reportada por outros autores em áreas plantadas com cana-de-açúcar. Diversos levantamentos realizados em canaviais de alguns estados brasileiros indicam a ocorrência de entre 12 e 37 espécies de FMAs. Azevedo et al. (2014) documentaram a presença de 37 espécies de FMAs em canaviais do estado brasileiro de São Paulo manejados diferentemente quanto à colheita, com ou sem queima da palha. Fors (2016), também no estado de São Paulo, verificou de 21 a 31 espécies de FMAs associadas a lavouras canavieiras sob diferentes sistemas de manejo. Reis et al. (1999) ao estudarem a composição das comunidades micorrízicas associadas ao plantio de 14 variedades de cana-de-açúcar em três localidades dos estados de Rio de Janeiro e Pernambuco, Brasil, verificaram a ocorrência de 18 espécies de FMAs. Mais recentemente, Sales (2018) identificou 12 espécies destes fungos em uma área produtora de cana no estado de Minas Gerais, Brasil.

A distribuição das espécies identificadas no presente trabalho por família ou gênero pode estar associada primeiramente ao número de espécies descritas para cada um destes níveis

taxonômicos (AMF-Phylogeny, 2019). Assim, a ordem Diversisporales concentra o maior número de espécies dentro do filo Glomeromycota, seguida de Glomerales. Já no nível de gênero, *Acaulospora* e *Glomus* também agrupam maior quantidade de espécies descritas. São desta forma comuns os estudos onde há predominância destas duas ordens e destes dois gêneros na composição de espécies das comunidades micorrízicas (Silva et al., 2014; Reyes et al., 2019; Vieira et al., 2019), sendo também um padrão comum em áreas produtoras de cana (Reis et al., 1999; Azevedo et al., 2014; Fors, 2016).

Em relação ao nível de dominância das espécies, houve equilíbrio entre espécies dominantes e muito comuns com as espécies comuns e raras, o que é incomum em monoculturas, particularmente em aquelas de longa duração. Os efeitos negativos de lavouras monoespecíficas sobre promoção da dominância de poucas espécies nas comunidades de FMAs têm sido documentados com frequência (Feldmann & Boyle, 1999; Oehl et al., 2003; Benett et al., 2012). Estima-se que a diversidade de FMAs em um ambiente é diretamente proporcional à diversidade florística do mesmo (Hiiesalu et al., 2014), podendo sofrer alterações quando estabelecidas monoculturas (Hausmann & Hawkes, 2009), principalmente se mantidas por vários anos consecutivos, como geralmente acontece com a cana-de-açúcar (Jiao et al., 2011). Entretanto, no presente trabalho, a ocorrência de espécies foi equilibrada entre os níveis de dominância, resultado esse talvez obtido pela extensa amostragem, confirmada com a estabilidade da curva de acúmulo de espécie (Figura 27) e pela grande variação geográfica e de solos amostrados, cubrindo praticamente todas as mesoregiões produtoras de cana-de-açúcar no estado de São Paulo.

As espécies *A. mellea*, *A. scrobiculata*, *G. macrocarpum*, *G. microagregatum*, *R. persica* e *S. tortuosa* foram classificadas como dominantes em relação à sua ocorrência nas áreas amostradas. Espécies como *G. macrocarpum* e *A. scrobiculata*, são comumente verificadas em diversos ecossistemas agrícolas e naturais (Cofré et al., 2019; Reyes et al., 2019). Particularmente, *A. scrobiculata* é reconhecida como cosmopolita, sendo a única espécie de FMA verificada até hoje em todos os continentes, incluindo a Antártida (Stürmer et al., 2018). Nesse sentido, é reconhecido que monoculturas prolongadas tendem a selecionar espécies de FMAs, embora estas possam não ser precisamente as mais eficientes e sim aquelas com plasticidade ecológica suficiente para resistirem às perturbações derivadas das práticas agrícolas. Apesar da ausência de especificidade entre os integrantes da simbiose micorrízica, resultados prévios sugerem níveis de preferência entre as espécies de plantas e espécies ou até linhagens de FMAs (Torrecillas et al., 2012; Fors et al., 2020).

Todas as seis espécies de FMAs aqui classificadas como dominantes têm sido previamente identificadas em solos plantados com cana-de-açúcar, porém com algumas variações nos níveis de dominância. Fors (2016) constatou a presença destas seis espécies em canaviais da região produtora de Quatá, São Paulo, destacando *S. tortuosa*, *A. mellea*, *A. scrobiculata*, *G. macrocarpum* e *G. microagregatum* como dominantes ou muito comuns, enquanto *R. persica* foi classificada como rara. Também em lavouras de São Paulo, Azevedo et al. (2014) reportaram ocorrência frequente de *G. macrocarpum*, *A. mellea* e *A. scrobiculata* em plantações de cana sob diferentes sistemas de manejo, sendo a presença de *S. tortuosa* também constatada, porém com baixa frequência de ocorrência. Das seis espécies em questão, Sales (2018) verificou *A. mellea* e *A. scrobiculata* em lavouras canavieiras de Minas Gerais. Não obstante, de acordo com a autora, apenas *A. scrobiculata* foi identificada associada a todas as variedades, tratamentos e safras compreendidas no estudo, enquanto *A. mellea* apresentou baixa frequência de ocorrência.

A baixa taxa de colonização micorrízica verificada nas plantas de cana pode estar associada à pouca quantidade de raízes finas no sistema radicular das plantas amostradas. Isto provavelmente devido à época de amostragem, que correspondeu com o período seco e frio da região, e o limite do período de colheita da variedade RB966928 que é precoce. Desta forma,

as plantas estavam no fim da fase de maturação e acúmulo de sacarose nos colmos, condições estas vinculadas à senescência do sistema radicular da cana (Liu & Bull, 2001; Vasconcelos & Casagrande, 2010). Por outro lado, a baixa precipitação pluviométrica da região nessa época pode causar maior esporulação dos FMAs no solo, que associado a decomposição das raízes mortas, podem liberar no solo esporos que cresceram internamente nas raízes. Assim, esta situação sazonal leva à maior presença de esporos no solo e menor colonização nas raízes. Alguns autores têm confirmado maior esporulação e colonização associadas às épocas secas e chuvosa, respectivamente (Sivakumar, 2013; Fors, 2016; Reyes et al., 2019). Por outro lado, associações similares entre os padrões de colonização ou esporulação e o estágio fisiológico do hospedeiro vegetal também têm sido reportadas com anterioridade (Bohrer et al., 2004), inclusive para a cana-de-açúcar, onde maior esporulação já foi associada à fase final do ciclo da cultura (Fors, 2016).

O número de estudos abordando tópicos relativos à ecologia e funcionamento da simbiose micorrízica na cana-de-açúcar tem aumentado nos últimos anos. Porém, são ainda escassos aqueles que abordam variação temporal da simbiose ao longo do ciclo da cultura. Nesse sentido, destaca-se o trabalho publicado por Claassens et al. (2018). Os autores documentaram colonização por FMAs de 50 a 75% em lavouras de cana da Austrália, sendo em média superior aos valores observados no presente estudo. Embora a elevada colonização micorrízica foi mantida ao longo do ciclo da cultura, foi constatada uma tendência à diminuição na colonização na fase final do ciclo da cana, sendo os maiores níveis de colonização verificados entre a quinta e décima primeira semana do ciclo. Na Índia, Datta e Kulkarni (2012) observaram valores médios de colonização por FMAs entre 27,75 e 57,17% em plantas de cana amostradas em dez plantações da cultura. Sivakumar (2013), ao estudar a simbiose micorrízica em plantas de cana de 14 canaviais indianos, constataram colonização média por FMAs entre 60 e 89%. No Brasil, Azevedo et al. (2014) verificaram colonização micorrízica em todas as plantas e variedades de cana amostradas, com valores médios de 30 a 52%. Também no Brasil, Sales (2018) registrou colonização micorrízica média de em torno de 50% dependendo da variedade de cana avaliada. Mais recentemente, Silva Barros et al. (2019) verificaram valores um pouco menores, oscilando entre 10 e 39% em plantas de cana cultivadas no estado de São Paulo, Brasil.

A correlação positiva entre a colonização por FMAs e o teor de P no solo aqui verificada (Figura 31) encontra correspondência com a literatura (Azevedo et al., 2014; Kelly et al., 2005) para cana-de-açúcar, porém contraria resultados normalmente obtidos para esta simbiose. A disponibilidade de P no solo é considerada um dos principais reguladores do funcionamento da simbiose micorrízica diminuindo a colonização com o aumento da disponibilidade (Cardoso et al., 2017). Moreira et al. (2019) observaram uma relação inversamente proporcional entre doses de adubado fosfatado e colonização micorrízica em plantas de café inoculadas com três espécies de FMAs. Já Liu et al. (2016) ao avaliarem o efeito da adubação fosfatada em plantas de milho cultivadas em áreas de agricultura convencional na China, verificaram correlação negativa entre o fornecimento de P e a colonização micorrízica.

Vale destacar ainda a ausência de relação direta entre a colonização micorrízica e a eficiência ou resposta do hospedeiro vegetal à simbiose (Kelly et al., 2005; Cardoso et al., 2017). Espécies selecionadas pela monocultura, conforme referido acima, adaptadas às condições derivadas de adubações contínuas e demais práticas agrícolas, podem colonizar as plantas. Porém, a funcionalidade e eficiência da simbiose nessas condições pode apresentar uma tendência à redução do caráter mutualista (Williams et al., 2017) ou à pouca resposta do hospedeiro vegetal à simbiose conforme relatado por Kelly et al. (2005) para a própria cana-de-açúcar. De acordo com resultados obtidos por Williams et al. (2017) níveis elevados de P no solo, derivados de adubações sucessivas, não afetam a biomassa intrarradicular de FMAs, porém diminuem a biomassa extrarradicular destes fungos o qual pode estar associado a um efeito reduzido da simbiose na translocação de água e nutrientes para o hospedeiro vegetal. Em

experimento de inoculação de cana-de-açúcar com diferentes linhagens de FMAs em solos com fertilidades diferentes, Fors et al. (2020) destacaram os solos com níveis médios de P por garantirem uma melhor resposta das plantas à inoculação. Kelly et al. (2005) verificaram os menores níveis de colonização micorrízica em plantas de cana sem aplicação de adubos fosfatados ou quando aplicada a dose máxima de 75 mg P kg⁻¹, observado aumento da colonização quando fornecido uma dose média de 25 mg P kg⁻¹.

Liu et al. (2016) destacaram que valores ótimos de P no solo podem estimular a ocupação radicular por FMAs, principalmente nas últimas fases do estágio reprodutivo das culturas, na qual há um aumento da dependência micorrízica. A coleta de raízes de plantas de cana na fase final da cultura pode assim ter alterado a relação esperada entre os níveis de P e a colonização micorrízica. Assim, mesmo os teores de P no solo das plantações amostradas serem na maioria médios a altos (Tabela 9), restando apenas uma minoria com teores muito baixos e baixos ou muito altos (Rossetto & Santiago, 2019), o período mais seco na época da amostragem associado à baixa mobilidade do P no solo, podem ter promovido baixo P na superfície das raízes, diminuindo seu efeito sobre a colonização micorrízica.

Trabalhos anteriormente publicados relatam a colonização simultânea de raízes por FMAs e DSE em diversos hospedeiros vegetais (Gucwa-Przepióra et al., 2016; Berthelot et al., 2018; Chakraborty et al., 2019). Sugere-se inclusive certa redundância funcional para ambas as simbioses estabelecidas entre as plantas e estes dois grupos fúngicos. Embora alguns dos mecanismos através dos quais a interação com DSE favorece as plantas são ainda pouco conhecidos em comparação àqueles dos FMAs, aumento na absorção de nutrientes e da tolerância a estresses bióticos e abióticos como presença de patógenos e condições de déficit hídrico ou níveis elevados de metais pesados no solo, têm sido associadas a ambas as simbioses (Likar & Regvar, 2013; Schouteden et al., 2015; Cardoso et al., 2017; Igiebon & Babalola, 2017; Vergara et al., 2018; Berthelot et al., 2019; Li et al., 2019).

De forma similar aos resultados aqui obtidos, Lugo et al. (2009) constataram correlação positiva entre a colonização por FMAs e DSE, assim como entre o número de arbuscúlos e a colonização por DSE em gramíneas nativas do Altiplano andino. Já Casazza et al. (2017) observaram correlação positiva entre o número de vesículas de FMAs e colonização por DSE em raízes de *Berardia subacaulis*. Porém, os autores não confirmaram relação direta entre a colonização geral por ambos grupos fúngicos, conforme verificado no presente estudo. Resultados opostos quanto aos níveis de ocupação radicular por FMAs e DSE têm sido igualmente verificados (Bueno de Mesquita et al., 2018).

A importância funcional da tripla interação planta-FMA-DSE, e os fatores que a determinam não são ainda totalmente compreendidos. Resultados obtidos a partir de ensaios *in vitro* sugerem que exsudatos do fungo DSE *Dreschlera* sp., dependendo da sua concentração, podem estimular ou inibir o desenvolvimento hifal do FMA *Gigaspora rosea* (Scervino et al., 2009). Della Monica et al. (2015) verificaram capacidade solubilizadora e mineralizadora de fosfatos inorgânico e orgânico por isolados de fungos DSE, e aumentos no teor de P em plantas de *Trifolium repens* quando co-inoculadas com alguns destes isolados e o FMA *G. rosea*. O estudo sugere assim sinergismo entre DSE e FMAs quanto ao melhoramento da nutrição fosfatada das plantas.

No caso da cana-de-açúcar, os relatos da ocorrência conjunta de FMAs e DSE são escassos, já que a maioria dos estudos abordando simbiontes fúngicos na cultura têm focado nas comunidades gerais ou, quando mais específicas, nos FMAs (Datta & Kulkarni, 2012; Azevedo et al., 2014; Romão-Dumaresq et al., 2016; Souza, De et al., 2016; Silva Barros, et al., 2019). Claassens et al. (2018) avaliaram a colonização por FMAs e DSE em canaviais de primeira e segunda soca na Austrália, verificando níveis de colonização por FMAs sempre superiores aos de DSE, o qual se encontra em correspondência com o verificado no presente trabalho. No Brasil, Fors et al. (2020), reportaram ocorrência de colonização por DSE em mudas

pré-brotadas de cana-de-açúcar previamente inoculadas com linhagens de FMAs em vários tipos de solos, destacando a coexistência de ambos fungos em segmentos radiculares das plantas. Os autores confirmaram níveis elevados de colonização por DSEs nativos, geralmente superiores aos de FMAs. Desta forma, os resultados aqui obtidos quando analisados em conjunto com aqueles relatados por Claassens et al. (2018) e Fors et al. (2020) sugerem que a correlação entre os níveis de ocupação radicular por FMAs e DSE pode ser influenciada pelo genótipo das espécies fúngicas, assim como pelas condições do ambiente edáfico no qual a planta se desenvolve. Futuras pesquisas envolvendo a relação de coexistência entre FMAs e DSE permitirão definir mais claramente quais são os fatores determinantes da tripla interação cana-de-açúcar-FMAs-DSE.

A glomalina é uma glicoproteína de origem fúngica, particularmente produzida pelos FMAs. Aproximadamente 80% da glomalina é sintetizada nas paredes das hifas destes fungos, e em menor proporção nos esporos, e liberada ao solo a partir da senescência destas estruturas (Rillig, 2004; Driver et al., 2005). Atualmente a fração de glomalina total operacionalmente quantificada é denominada de proteína do solo relacionada à glomalina (T-GRSP – *total glomalin-related soil protein*), sendo a fração mais recentemente produzida ou modificada denominada de facilmente extraível (EE-GRSP – *easily extractable GRSP*) (Rillig, 2004; Singh et al., 2013). A correlação positiva aqui verificada entre os teores total e facilmente extraível de GRSP encontra-se em correspondência com resultados previamente documentados (Lovelock et al., 2004; Bai et al., 2009).

Os fatores determinantes da deposição e conseqüentemente dos teores de GRSP no solo não estão totalmente elucidados. Destacam-se o clima, a textura do solo, a vegetação e a diversidade da comunidade micorrízica como alguns dos componentes moduladores do conteúdo de GRSP no ambiente edáfico (Rillig et al., 2001). Os valores médios de EE-GRSP e T-GRSP verificados no presente estudo (EE-GRSP = 0,55 mg g⁻¹; T-GRSP = 3,86 mg g⁻¹) se assemelham a teores previamente relatados para áreas produtoras de cana. Em lavouras canavieiras do estado de São Paulo, Brasil foram reportados teores médios de EE-GRSP entre 0,85 e 1,18 mg g⁻¹ e de GRSP entre 3,33 e 4,18 mg g⁻¹, valores que não foram afetados pela rotação com outras culturas durante a fase de pousio da cana (Truber & Fernandes, 2014).

Correlação positiva entre as concentrações de GRSP e os níveis de carbono e nitrogênio no solo, da mesma forma que no presente estudo, tem sido previamente constatada por outros autores (Lovelock et al., 2004; Bai et al., 2009; Yang et al., 2017). De acordo com Rillig et al. (2001) esta proteína pode contribuir em até 4-5% do carbono e nitrogênio totais do solo, o que explica esta correlação. O pH não apresentou relação com os níveis de GRSP, sendo que em alguns trabalhos o pH é negativamente correlacionado a esta proteína (Lovelock et al., 2004; Bai et al., 2009). Porém, foi constatada correlação negativa entre o pH e a acidez potencial do solo (H+Al) em concordância com resultados prévios (Pereira et al., 1998), sendo que a acidez potencial correlacionou-se positivamente com as concentrações de T-GRSP e EE-GRSP no solo (Figura 31).

Não foi confirmado efeito significativo das características químicas do solo sobre a riqueza de espécies. Embora a disponibilidade de P no solo é comumente citada entre os principais moduladores da simbiose micorrízica, os resultados relativos ao seu efeito sobre a diversidade das comunidades micorrízicas não são consistentes. Williams et al. (2017) estudaram o efeito, a longo prazo, da adubação fosfatada e nitrogenada sobre as comunidades de FMAs. Os autores verificaram que apenas a adubação nitrogenada afetava de forma negativa a riqueza de espécies, não havendo efeito da adubação fosfatada sobre este índice ecológico. Já Xiang et al. (2014) destacaram o teor de P disponível no solo como um dos fatores que mais afeta a diversidade de espécies de FMAs em pastagens e áreas agrícolas região norte da China.

De acordo com Goss et al. (2017) o efeito da aplicação de P sobre a diversidade de FMAs depende da capacidade de diferentes espécies de FMAs de colonizar as raízes das plantas

sob diferentes níveis de P. Assim, o teor de P determinaria quais espécies estariam presentes em um determinado sistema, e não precisamente a número delas. O anterior está em correspondência com os resultados da análise de RDA, onde a ocorrência de algumas espécies de FMAs foi significativamente influenciada pelos teores de P. Adicionalmente, o teor de K e a acidez potencial, assim como o teor de Al e o pH do solo também modularam a ocorrência de determinadas espécies. Esses resultados são similares àqueles obtidos por Azevedo et al. (2014). De acordo com os autores, os atributos químicos do solo são importantes na determinação da estrutura da comunidade micorrízica, porém são alterados em função da variedade de cana plantada. Particularmente o pH é comumente citado como um dos fatores que mais influenciam a composição das comunidades microbianas e de FMAs em particular (Lauber et al., 2009; Alguacil et al., 2016; Bainard et al., 2016). Isso associado à capacidade do pH de atuar diretamente sobre a fisiologia dos microrganismos nativos ou indiretamente através da regulação da biodisponibilidade de nutrientes no solo (Lauber et al., 2009; Xu et al., 2017b).

5.7 CONCLUSÕES

A monocultura canavieira mantém uma comunidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares com riqueza de espécies moderadamente elevada, com equilíbrio entre espécies dominantes, comuns e raras.

As espécies dominantes na rizosfera da cana de açúcar variedade RB966928 cultivada no estado de São Paulo são *Acaulospora mellea*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus macrocarpum*, *Glomus microaggregatum*, *Racocetra persica* e *Sieverdingia tortuosa* o que sugere que essas espécies se multiplicam mais quando associadas à variedade RB966928, embora isso não seja um indicador de sua eficiência simbiótica para a cultura, de modo que se recomenda que essas espécies sejam estudadas em pesquisas futuras.

A variedade de cana RB966928 não é colonizada apenas por FMAs, mas também por DSE. Assim, a co-ocorrência de ambas simbioses nas raízes, com correlação positiva entre suas colonizações do sistema radicular, sugere sinergismo e não competição entre estes fungos, e que as variáveis ambientais que promovem ou inibem a colonização, agem de forma conjunta em ambas as simbioses.

As principais características químicas do solo que influenciam a ocorrência de espécies de FMAs nas lavouras cana da variedade RB966928 são o pH, a acidez potencial e os teores de K, P e Al no solo. Existe correlação entre os teores de glomalina e a maioria das características químicas de fertilidade do solo, sugerindo que o acúmulo no solo desta proteína, sintetizada pelos Glomeromycotas, promove a fertilidade e a disponibilidade de cátions nos solos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, R.; VERMA, A.; SATLEWAL, A. Bioprospecting PGPR Microflora by Novel Immunobased Techniques. In: PRASAD, R.; GILL, S.S.; TUTEJA, N. Crop Improvement Through Microbial Biotechnology. Elsevier, 2018. p.465–478.
- AGUIAR, F.M.; LANZA, F.E.; COSTA, R.V.; SILVA, D.D.; LANA, U.G.P.; GUIMARÃES, E.A.; GOMES, G.R.; COTA, L.V. First Report of *Phaeocystostroma ambiguum* Causing Maize Stalk Rot in Brazil. Plant Disease, v.100, p.2528–2528, 2016.
- ALGUACIL, M. DEL M.; TORRES, M.P.; MONTESINOS-NAVARRO, A.; ROLDÁN, A. Soil Characteristics Driving Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in Semiarid Mediterranean Soils. Applied and Environmental Microbiology, v.82, p.3348–3356, 2016.
- ALI-SHTAYEH, M.S.; JAMOUS, R.M.; YAGHMOUR, R.M.-R. Mycology Manual. Nablus, 1998. 143p.
- AMF-PHYLOGENY. Glomeromycota species list. Disponível em: <http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_taxonomy.html>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- ARAÚJO, O.J.L. Similaridade genética entre variedades de arroz utilizando RAPD e avaliação da cinética de absorção e de expressão de transportadores de nitrato. 2010. 44p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- ASKUN, T. Introductory Chapter: Fusarium: Pathogenicity, Infections, Diseases, Mycotoxins and Management. In: ASKUN, T. *Fusarium* - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers. London: IntechOpen, p.1-12.
- ATANASOVA, L.; DRUZHININA, I.S.; JAKLITSCH, W.M. Two Hundred *Trichoderma* Species Recognized on the Basis of Molecular Phylogeny. In: Mukherjee, P.K.; Horwitz, B.A.; Singh, U.S.; Mukherjee, M.; Schmoll, M. *Trichoderma: biology and applications*. CABI International, 2013. p.10–42.
- AVINASH, K.S.; ASHWINI, H.S.; BABU, H.N.R.; KRISHNAMURTHY, Y.L. Antimicrobial Potential of Crude Extract of *Curvularia lunata*, an Endophytic Fungi Isolated from *Cymbopogon caesius*. Journal of Mycology, v.2015, p.1–4, 2015.
- AVIO, L.; CASTALDINI, M.; FABIANI, A.; BEDINI, S.; SBRANA, C.; TURRINI, A.; GIOVANNETTI, M. Impact of nitrogen fertilization and soil tillage on arbuscular mycorrhizal fungal communities in a Mediterranean agroecosystem. Soil Biology and Biochemistry, v.67, p.285–294, 2013.
- AZEVEDO, L.C.B.; STÜRMER, S.L.; LAMBAIS, M.R. Early changes in arbuscular mycorrhiza development in sugarcane under two harvest management systems. Brazilian Journal of Microbiology, v.45, p.995–1005, 2014.
- AZIZ, T.; HABTE, M. Determining vesicular-arbuscular mycorrhizal effectiveness by monitoring P status of leaf disks. Canadian Journal of Microbiology, v.33, p.1097-1101, 1987.
- BACON, C.W.; GLENN, A.E.; YATES, I.E. FUSARIUM VERTICILLIOIDES: MANAGING THE ENDOPHYTIC ASSOCIATION WITH MAIZE FOR REDUCED FUMONISINS ACCUMULATION. Toxin Reviews, v.27, p.411–446, 2008.
- BACON, C.W.; YATES, I.E. Endophytic Root Colonization by *Fusarium* Species: Histology, Plant Interactions and Toxicity. In: SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. Microbial Root Endophytes. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p.133–152.

- BADER, A.N.; SALERNO, G.L.; COVACEVICH, F.; CONSOLO, V.F. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of King Saud University - Science*, 2019.
- BAI, C.; HE, X.; TANG, H.; SHAN, B.; ZHAO, L. Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin and soil enzymes under the canopy of *Astragalus adsurgens* Pall. in the Mu Us sandland, China. *Soil Biology and Biochemistry*, v.41, p.941–947, 2009.
- BAINARD, L.D.; HAMEL, C.; GAN, Y. Edaphic properties override the influence of crops on the composition of the soil bacterial community in a semiarid agroecosystem. *Applied Soil Ecology*, v.105, p.106–168, 2016.
- BAIRD, R.E.; STOKES, C.E.; WINDHAM, A.S. Basidiomycota: Diverse Complex of Saprophytic, Parasitic, and Symbiotic Fungi. In: *Plant pathology concepts and laboratory exercises*. Taylor & Francis, 2017. p.237–248.
- BAUM, C.; HRYNKIEWICZ, K.; SZYMAŃSKA, S.; VITOW, N.; HOEBER, S.; FRANSSON, P.M.A.; WEIH, M. Mixture of *Salix* Genotypes Promotes Root Colonization with Dark Septate Endophytes and Changes P Cycling in the Mycorrhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, v.9, 2018.
- BAZGHALEH, N.; HAMEL, C.; GAN, Y.; TAR'AN, B.; KNIGHT, J.D. Genotype-Specific Variation in the Structure of Root Fungal Communities is Related to Chickpea Plant Productivity. *Applied and Environmental Microbiology*, v.81, p.2368–2377, 2015.
- BAZGHALEH, N.; HAMEL, C.; GAN, Y.; TAR'AN, B.; KNIGHT, J.D. Genotypic variation in the response of chickpea to arbuscular mycorrhizal fungi and non-mycorrhizal fungal endophytes. *Canadian Journal of Microbiology*, v.64, p.265–275, 2018.
- BEGUM, N.; QIN, C.; AHANGER, M.A.; RAZA, S.; KHAN, M.I.; ASHRAF, M.; AHMED, N.; ZHANG, L. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v.10, 2019.
- BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J.I.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, v.63, p.94–104, 2013.
- BENNETT, A.J.; BENDING, G.D.; CHANDLER, D.; HILTON, S. Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. *Biological Reviews*, v.87, p.52–71, 2012.
- BENGYELLA, L.; IFTIKHAR, S.; NAWAZ, K.; FONMBOH, D.J.; YEKWA, E.L.; JONES, R.C.; NJANU, Y.M.T.; ROY, P. Biotechnological application of endophytic filamentous *Bipolaris* and *Curvularia*: a review on bioeconomy impact. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.35, n.69, p.1-14, 2019.
- BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology, The genus*. v.72, p.1–401, 2012.
- BENSCH, K.; GROENEWALD, J.Z.; BRAUN, U.; DIJKSTERHUIS, J.; JESÚS YÁÑEZ-MORALES, M. DE; CROUS, P.W. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology, Saprobic and Phytopathogenic Dothideomycetes*. v.82, p.23–74, 2015.

- BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.84, p.11–18, 2009.
- BERG, G.; RYBAKOVA, D.; GRUBE, M.; KÖBERL, M. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, v.67, p.995–1002, 2016.
- BERTHELOT, C.; BLAUDEZ, D.; BEGUIRISTAIN, T.; CHALOT, M.; LEYVAL, C. Co-inoculation of *Lolium perenne* with *Funneliformis mosseae* and the dark septate endophyte *Cadophora* sp. in a trace element-polluted soil. *Mycorrhiza*, v.28, p.301–314, 2018.
- BERTHELOT, C.; CHALOT, M.; LEYVAL, C.; BLAUDEZ, D. From Darkness to Light: Emergence of the Mysterious Dark Septate Endophytes in Plant Growth Promotion and Stress Alleviation. In: HODKINSON, T.R.; DOOHAN, F.M.; SAUNDERS, M.J.; MURPHY, B.R. *Endophytes for a Growing World*. Cambridge University Press, 2019. p.143–164.
- BERTHELOT, C.; PERRIN, Y.; LEYVAL, C.; BLAUDEZ, D. Melanization and ageing are not drawbacks for successful agro-transformation of dark septate endophytes. *Fungal Biology*, v.121, p.652–663, 2017.
- BHATIA, C.; MUKHERJEE, P.K. Microbial Technologies for Sustainable Crop Production. In: PRASAD, R.; GILL, S.S.; TUTEJA, N. *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. Elsevier, 2018. p.255–261.
- BOHRER, K.E.; FRIESE, C.F.; AMON, J.P. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza*, v.14, p.329–337, 2004.
- BOKATI, D.; HERRERA, J.; POUDEL, R. Soil Influences Colonization of Root-Associated Fungal Endophyte Communities of Maize, Wheat, and Their Progenitors. *Journal of Mycology*, v.2016, p.1–9, 2016.
- BONFIM, J.A.; VASCONCELLOS, R.L.F.; BALDESIN, L.F.; SIEBER, T.N.; CARDOSO, E.J.B.N. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. *Fungal Ecology*, v.20, p.202–210, 2016.
- BONITO, G.; REYNOLDS, H.; ROBESON, M.S.; NELSON, J.; HODKINSON, B.P.; TUSKAN, G.; SCHADT, C.W.; VILGALYS, R. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology*, v.23, p.3356–3370, 2014.
- BORCARD, D.; GILLET, F.; LEGENDRE, P. *Numerical Ecology with R*. Cham: Springer International Publishing, 2018, 435p.
- BORDONAL, R. DE O.; CARVALHO, J.L.N.; LAL, R.; FIGUEIREDO, E.B. DE; OLIVEIRA, B.G. DE; LA SCALA, N. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v.38, p.13, 2018.
- BRAGA JÚNIOR, R.L.C.; LANDELL, M.G.A.; SILVA, D.N.; BIDÓIA, M.A.P.; SILVA, T.N.; THOMAZINHO JÚNIOR, J.R.; SILVA, V.H.P. Censo varietal IAC de cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil – Safra 2017/18. Campinas - SP: Instituto Agrônomo de Campinas, 2018. 50p.
- BUENO DE MESQUITA, C.P.; SARTWELL, S.A.; ORDEMANN, E.V.; PORAZINSKA, D.L.; FARRER, E.C.; KING, A.J.; SPASOJEVIC, M.J.; SMITH, J.G.; SUDING, K.N.; SCHMIDT, S.K. Patterns of root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes across a mostly-unvegetated, high-elevation landscape. *Fungal Ecology*, v.36, p.63–74, 2018.

- CARBONE, I.; KOHN, L.M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, v.91, p.553–556, 1999.
- CARDOSO, E.J.B.N.; NOGUEIRA, M.A.; ZANGARO, W. Importance of mycorrhizae in tropical soils. In: AZEVEDO, J.L.; QUECINE, M.C. Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. AG: Springer International Publishing, 2017. p.245–267.
- CARENHO, R.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; BALOTA, E.M.; COLOZZI-FILHO, A. Fungos micorrízicos arbusculares em agrossistemas Brasileiros. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. Lavras: UFLA, 2010. p.215–149.
- CASAZZA, G.; LUMINI, E.; ERCOLE, E.; DOVANA, F.; GUERRINA, M.; ARNULFO, A.; MINUTO, L.; FUSCONI, A.; MUCCIARELLI, M. The abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi are linked to the soil chemistry of screes and to slope in the Alpic paleo-endemic *Berardia subacaulis*. *PLoS ONE*, v.12, 2017.
- CEPEA. PIB Cadeias do Agronegócio, 1o semestre de 2017. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-de-cadeias-agropecuarias.aspx>>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- CHAGNON, P.-L. Ecological and evolutionary implications of hyphal anastomosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, v.88, p.437–444, 2014.
- CHAKRABORTY, K.; BANIK, S.; DEBNATH, A.; DAS, A.R.; SAHA, A.K.; DAS, P. Arbuscular mycorrhiza and dark septate endophyte fungal associations of *Oryza sativa* L. under field condition: colonization features and their occurrence. *Plant Science Today*, v.6, p.63, 2019.
- CHENCHOUNI, H.; MEKAHLIA, M.N.; BEDDIAR, A. Effect of inoculation with native and commercial arbuscular mycorrhizal fungi on growth and mycorrhizal colonization of olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, v.261, p.108969, 2020.
- CHERUBIN, M.R.; KARLEN, D.L.; CERRI, C.E.P.; FRANCO, A.L.C.; TORMENA, C.A.; DAVIES, C.A.; CERRI, C.C. Soil Quality Indexing Strategies for Evaluating Sugarcane Expansion in Brazil. *PLOS ONE*, v.11, 2016.
- CLAASSENS, A.; NOCK, C.J.; ROSE, M.T.; ZWIETEN, L.V.; ROSE, T.J. Colonisation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes in the sugarcane crop cycle. *Rhizosphere*, v.7, p.18–26, 2018.
- COFRÉ, M.N.; SOTERAS, F.; ROSARIO IGLESIAS, M. DEL; VELÁZQUEZ, S.; ABARCA, C.; RISIO, L.; ONTIVERO, E.; CABELLO, M.N.; DOMÍNGUEZ, L.S.; LUGO, M.A. Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in South America: A Review. In: PAGANO, M.C.; LUGO, M.A. Mycorrhizal Fungi in South America. *Fungal Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p.49–72.
- COLOMBARI FILHO, J.M.; RESENDE, M.D.V. DE; MORAIS, O.P. DE; CASTRO, A.P. DE; GUIMARÃES, É.P.; PEREIRA, J.A.; UTUMI, M.M.; BRESEGHELLO, F. Upland rice breeding in Brazil: a simultaneous genotypic evaluation of stability, adaptability and grain yield. *Euphytica*, v.192, p.117–129, 2013.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2019. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar (2018/19). Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 15 out. 2019.
- CORDELL, D.; WHITE, S. Peak Phosphorus: Clarifying the Key Issues of a Vigorous Debate about Long-Term Phosphorus Security. *Sustainability*, v.3, p.2027–2049, 2011.

- DAMM, U.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W. *Coniochaeta* (Lecythophora), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of Prunus trees. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v.24, p.60–80, 2010.
- DATTA, P.; KULKARNI, M. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Diversity in Sugarcane Rhizosphere in Relation with Soil Properties. *Notulae Scientia Biologicae*, v.4, p.66–74, 2012.
- DELA CUEVA, F.; DE TORRES, R.; CASTRO, A. DE; MENDOZA, J.; BALENDRES, M.A. Susceptibility of sugarcane to red rot caused by two *Fusarium* species and its impact on stalk sugar level. *Journal of Plant Pathology*, v.101, p.639–646, 2019.
- DELLA MONICA, I.F.; SAPARRAT, M.C.N.; GODEAS, A.M.; SCERVINO, J.M. The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecology*, v.17, p.10–17, 2015.
- DISSANAYAKE, A.J.; PURAHONG, W.; WUBET, T.; HYDE, K.D.; ZHANG, W.; XU, H.; ZHANG, G.; FU, C.; LIU, M.; XING, Q.; LI, X.; YAN, J. Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). *Fungal Diversity*, v.90, p.85–107, 2018.
- DONG, M.; YANG, Z.; CHENG, G.; PENG, L.; XU, Q.; XU, J. Diversity of the Bacterial Microbiome in the Roots of Four *Saccharum* Species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. *Frontiers in Microbiology*, v.9, p.267, 2018.
- DRIVER, J.D.; HOLBEN, W.E.; RILLIG, M.C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, v.37, p.101–106, 2005.
- DUBEY, K.K.; KUMAR, P. Microbes in Crop Improvement: Future Challenges and Perspective. In: *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. Elsevier, 2018. p.415–425.
- DWIBEDI, V.; SAXENA, S. *Arcopilus aureus*, a Resveratrol-Producing Endophyte from *Vitis vinifera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.186, p.476–495, 2018.
- EPPO-Q-Bank Database. Disponível em: <<https://qbank.eppo.int/fungi/>>. Acesso em: 5 ago. 2019.
- FATIMA, N.; MUHAMMAD, S.A.; KHAN, I.; QAZI, M.A.; SHAHZADI, I.; MUMTAZ, A.; HASHMI, M.A.; KHAN, A.K.; ISMAIL, T. *Chaetomium* endophytes: a repository of pharmacologically active metabolites. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.38, p.136, 2016.
- FELDMANN, F.; BOYLE, C. Weed-mediated stability of arbuscular mycorrhizal effectiveness in maize monocultures. *Journal of Applied Botany*, v.73, p.1–5, 1999.
- FERNANDES, E.G.; PEREIRA, O.L.; SILVA, C.C. DA; BENTO, C.B.P.; QUEIROZ, M.V. DE. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiological Research*, v.181, p.84–92, 2015.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, v.38, p.109–112, 2014.
- FERREIRA, L.M. Características Morfológicas, Fisiológicas e Transcriptoma em Variedades de Arroz (*Oryza sativa* L.) Contrastantes quanto a Tolerância ao Estresse Hídrico. 2017. 110p. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

- FERREIRA, M.C.; CANTRELL, C.L.; WEDGE, D.E.; GONÇALVES, V.N.; JACOB, M.R.; KHAN, S.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.71, p.163–169, 2017.
- FORS, R.O. Identificação, quantificação e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares no sistema de produção de cana-de-açúcar. 2016. 77p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- FORS, R.O.; JÚNIOR, O.J.S.; CARNEIRO, M.A.C.; BERBARA, R.L.L. Selection of arbuscular mycorrhizal fungi for sugarcane in four soils with the presence of dark septate endophytes. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.42, 2020.
- GAO, S.; LI, Y.; GAO, J.; SUO, Y.; FU, K.; LI, Y.; CHEN, J. Genome sequence and virulence variation-related transcriptome profiles of *Curvularia lunata*, an important maize pathogenic fungus. *BMC Genomics*, v.15, p.1–18, 2014.
- GARDENER, M. *Community Ecology: Analytical Methods Using R and Excel*. Pelagic Publishing Ltd, 2014. 566p.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1323–1330, 1995.
- GONÇALVES, S.S.; STCHIGEL, A.M.; CANO, J.F.; GODOY-MARTINEZ, P.C.; COLOMBO, A.L.; GUARRO, J. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section Flavi. *Medical Mycology*, v.50, p.152–160, 2012.
- GONZÁLEZ-TEUBER, M.; VILO, C.; BASCUÑÁN-GODOY, L. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genomics Data*, v.11, p.109–112, 2017.
- GOSS, M.J.; CARVALHO, M.; BRITO, I. Diversity in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In: GOSS, M.J.; CARVALHO, M.; BRITO, I. *Functional Diversity of Mycorrhiza and Sustainable Agriculture*. Elsevier, 2017. p.59–79.
- GROENEWALD, J.Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; SHIN, H.-D.; PARK, J.-H.; JAMA, A.N.; GROENEWALD, M.; BRAUN, U.; CROUS, P.W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology*, v.75, p.115–170, 2013.
- GRÜNIG, C.R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T.N. Structure of Diversity in Dark Septate Endophytes: From Species to Genes. In: PIRTTILÄ, A.M.; FRANK, A.C. *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Forestry Sciences. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p.3–30.
- GRÜNIG, C.R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T.N.; HOLDENRIEDER, O. Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. *Botany*, v.86, p.1355–1369, 2008.
- GUCWA-PRZEPIÓRA, E.; CHMURA, D.; SOKOŁOWSKA, K. AM and DSE colonization of invasive plants in urban habitat: a study of Upper Silesia (southern Poland). *Journal of Plant Research*, v.129, p.603–614, 2016.
- HARDOIM, P.R.; HARDOIM, C.C.P.; OVERBEEK, L.S. VAN; ELSAS, J.D. VAN. Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. *PLOS ONE*, v.7, p.e30438, 2012.

- HARDOIM, P.R.; OVERBEEK, L.S. VAN; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, v.79, p.293–320, 2015.
- HARDOIM, P.R.; OVERBEEK, L.S. VAN; ELSAS, J.D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, v.16, p.463–471, 2008.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma species* — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, p.43–56, 2004.
- HARRINGTON, A.H.; OLMO-RUIZ, M. DEL; U’REN, J.M.; GARCIA, K.; PIGNATTA, D.; WESPE, N.; SANDBERG, D.C.; HUANG, Y.-L.; HOFFMAN, M.T.; ARNOLD, A.E. *Coniochaeta endophytica* sp. nov., a foliar endophyte associated with healthy photosynthetic tissue of *Platycladus orientalis* (Cupressaceae). *Plant and Fungal Systematics*, v.64, p.65–79, 2019.
- HAUSMANN, N.T.; HAWKES, C.V. Plant neighborhood control of arbuscular mycorrhizal community composition. *New Phytologist*, v.183, p.1188–1200, 2009.
- HE, C.; WANG, W.; HOU, J. Characterization of Dark Septate Endophytic Fungi and Improve the Performance of Liquorice under Organic Residue Treatment. *Frontiers in Microbiology*, v.10, p.1-14, 2019.
- HERRERA, J.; POUDEL, R.; BOKATI, D. Assessment of root-associated fungal communities colonizing two species of tropical grasses reveals incongruence to fungal communities of North American native grasses. *Fungal Ecology*, v.6, p.65–69, 2013.
- HIIESALU, I.; PÄRTEL, M.; DAVISON, J.; GERHOLD, P.; METSIS, M.; MOORA, M.; ÖPIK, M.; VASAR, M.; ZOBEL, M.; WILSON, S.D. Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi: associations with grassland plant richness and biomass. *New Phytologist*, v.203, p.233–244, 2014.
- HOU, L.; HE, X.; LI, X.; WANG, S.; ZHAO, L. Species composition and colonization of dark septate endophytes are affected by host plant species and soil depth in the Mu Us sandland, northwest China. *Fungal Ecology*, v.39, p.276–284, 2019.
- HUANG, W.; SUN, D.; FU, J.; ZHAO, H.; WANG, R.; AN, Y. Effects of Continuous Sugar Beet Cropping on Rhizospheric Microbial Communities. *Genes*, v.11, p.13, 2020.
- HUANG, Y.-K. Colour illustration of diagnosis and control for modern sugarcane diseases, pests and weeds. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2018. 420p.
- HULSE, J.D. First Report of Dark Septate Endophytes imaged in *Cucurbita maxima* grown in the Eastern United States. *Acta Scientific Agriculture*, v.2, p.61–64, 2018.
- IAMANAKA, B.T.; SOUZA LOPES, A. DE; MARTINS, L.M.; FRISVAD, J.C.; MEDINA, A.; MAGAN, N.; SARTORI, D.; MASSI, F.P.; FUNGARO, M.H.P.; TANIWAKI, M.H. *Aspergillus* section Flavi diversity and the role of *A. novoparasiticus* in aflatoxin contamination in the sugarcane production chain. *International Journal of Food Microbiology*, v.293, p.17–23, 2019.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal. Tabela 1612 - Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612#notas-tabela>>. Acesso em: 6 jan. 2020.

IBGE. Divisão regional do Brasil em mesorregiões e microrregiões geográficas. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-20RJ/DRB/Divisao%20regional_v01.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2020.

IBGE. Geografia da cana-de-açúcar. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101436.pdf>>. Acesso em: 6 jan. 2020.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Tabela 1612 - Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612#notas-tabela>>. Acesso em: 6 jan. 2020.

IGIEBON, N.O.; BABALOLA, O. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.101, p.4871–4881, 2017.

IMO, M. Analysis of Nutritional Interactions in Cropping Systems. In: SHARMA, P. *Crop Production Technologies*. InTech, 2012, p.221-242

IMPULLITTI, A.E.; MALVICK, D.K. Fungal endophyte diversity in soybean. *Journal of Applied Microbiology*, v.114, p.1500–1506, 2013.

INVAM International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Disponível em: <<https://invam.wvu.edu/>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

JIAO, H.; CHEN, Y.; LIU, R. Diversity of mycorrhizal greenhouse soils continuously planted to watermelon in North China. *Mycorrhiza*, v.21, p.681–688, 2011.

JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J.M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, v.140, p.295–310, 1998.

JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J.M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, v.140, p.295–310, 1998.

KAANICHE, F.; HAMED, A.; ABDEL-RAZEK, A.S.; WIBBERG, D.; ABDISSA, N.; EL EUCH, I.Z.; ALLOUCHE, N.; MELLOULI, L.; SHAABAN, M.; SEWALD, N. Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus *Curvularia* sp. isolated from *Rauwolfia macrophylla*. *PLOS ONE*, v.14, 2019.

KATSURAYAMA, A.M.; MARTINS, L.M.; IAMANAKA, B.T.; FUNGARO, M.H.P.; SILVA, J.J.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H. Occurrence of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. *International Journal of Food Microbiology*, v.266, p.213–221, 2018.

KAVROULAKIS, N.; DOUPIS, G.; PAPADAKIS, I.E.; EHALIOTIS, C.; PAPADOPOULOU, K.K. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere*, v.6, p.77–85, 2018.

KELLY, R.M.; EDWARDS, D.G.; THOMPSON, J.P.; MAGAREY, R.C. Growth responses of sugarcane to mycorrhizal spore density and phosphorus rate. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.56, p.1405, 2005.

KEPLER, R.M.; MAUL, J.E.; REHNER, S.A. Managing the plant microbiome for biocontrol fungi: examples from Hypocreales. *Current Opinion in Microbiology*, v.37, p.48–53, 2017.

KHAN, M.N.; MOBIN, M.; ABBAS, Z.K.; ALAMRI, S.A. Fertilizers and Their Contaminants in Soils, Surface and Groundwater. In: *Encyclopedia of the Anthropocene*. Elsevier, 2018. p.225–240.

- KHAN, Z.; GENÉ, J.; AHMAD, S.; CANO, J.; AL-SWEIH, N.; JOSEPH, L.; CHANDY, R.; GUARRO, J. *Coniochaeta polymorpha*, a new species from endotracheal aspirate of a preterm neonate, and transfer of *Lecythophora* species to *Coniochaeta*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.104, p.243–252, 2013.
- KNAPP, D.G.; KOVÁCS, G.M.; ZAJTA, E.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v.35, p.87–100, 2015.
- KNAPP, D.G.; NÉMETH, J.B.; BARRY, K.; HAINAUT, M.; HENRISSAT, B.; JOHNSON, J.; KUO, A.; LIM, J.H.P.; LIPZEN, A.; NOLAN, M.; OHM, R.A.; TAMÁS, L.; GRIGORIEV, I.V.; SPATAFORA, J.W.; NAGY, L.G.; KOVÁCS, G.M. Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific Reports*, v.8: 6321, 2018.
- KNAPP, D.G.; PINTYE, A.; KOVÁCS, G.M. The Dark Side Is Not Fastidious – Dark Septate Endophytic Fungi of Native and Invasive Plants of Semiarid Sandy Areas. *PLoS ONE*, v.7, p.e32570, 2012.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v.35, p.1547–1549, 2018.
- KUSAI, N.A.; MIOR ZAKUAN AZMI, M.; ZULKIFLY, S.; YUSOF, M.T.; MOHD ZAINUDIN, N.A.I. Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. *Rendiconti Lincei*, v.27, p.205–214, 2016.
- LAMPRECHT, S.C.; CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; TEWOLDEMEDHIN, Y.T.; MARASAS, W.F.O. Diaporthaceae associated with root and crown rot of maize. *IMA Fungus: The Global Mycological Journal*, v.2, p.13–24, 2011.
- LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, p.5111–5120, 2009.
- LI, L.; ZHANG, X.; TAN, X.; SUN, B.; WU, B.; YU, M.; ZHANG, T.; ZHANG, Y.; DING, G. Rhinoclactones A-E, Resorcylic Acid Analogs from Desert Plant Endophytic Fungus *Rhinocladia similis*. *Molecules*, v.24, p.1405, 2019.
- LI, T.; LIU, M.J.; ZHANG, X.T.; ZHANG, H.B.; SHA, T.; ZHAO, Z.W. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of The Total Environment*, v.409, p.1069–1074, 2011.
- LI, X.; HE, C.; HE, X.; SU, F.; HOU, L.; REN, Y.; HOU, Y. Dark septate endophytes improve the growth of host and non-host plants under drought stress through altered root development. *Plant and Soil*, v.439, p.259–272, 2019.
- LI, X.; HE, X.; HOU, L.; REN, Y.; WANG, S.; SU, F. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. *Scientific Reports*, v.8, p.7896, 2018.
- LIANG, Y.; RAN, S.-F.; BHAT, J.; HYDE, K.D.; WANG, Y.; ZHAO, D.-G. *Curvularia microspora* sp. nov. associated with leaf diseases of *Hippeastrum striatum* in China. *MycKeys*, p.49–61, 2018.
- LIKAR, M.; REGVAR, M. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant and Soil*, v.370, p.593–604, 2013.

- LIM, G.S.; BALKE, M.; MEIER, R. Determining species boundaries in a world full of rarity: singletons, species delimitation methods. *Systematic Biology*, v.61, p.165–169, 2012.
- LIN, W.; WU, L.; LIN, S.; ZHANG, A.; ZHOU, M.; LIN, R.; WANG, H.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; LIN, R. Metaproteomic analysis of ratoon sugarcane rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, v.13, p.135, 2013.
- LING, X.; WENLONG, Z.; LIPING, Q.; TAOJU, L.; NARISAWA, K.; SONG, L.; XING, D.; SHITONG, L. Effects of dark septate endophytes (DSE) on sugarcane seedling growth. *Journal of Southern Agriculture*, v.44, p.1827–1830, 2013.
- LIU, D.L.; BULL, T.A. Simulation of biomass and sugar accumulation in sugarcane using a process-based model. *Ecological Modelling*, v.144, p.181–211, 2001.
- LIU, S.; ZHAO, Y.; HEERING, C.; JANIÁK, C.; MÜLLER, W.E.G.; AKONÉ, S.H.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Sesquiterpenoids from the Endophytic Fungus *Rhinochloidiella similis*. *Journal of Natural Products*, v.82, p.1055–1062, 2019.
- LIU, W.; ZHANG, Y.; JIANG, S.; DENG, Y.; CHRISTIE, P.; MURRAY, P.J.; LI, X.; ZHANG, J. Arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots respond differently to phosphorus inputs in an intensively managed calcareous agricultural soil. *Scientific Reports*, v.6, p.24902, 2016.
- LOFGREN, L.A.; LEBLANC, N.R.; CERTANO, A.K.; NACHTIGALL, J.; LABINE, K.M.; RIDDLE, J.; BROZ, K.; DONG, Y.; BETHAN, B.; KAUFER, C.W.; KISTLER, H.C. *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist*, v.217, p.1203–1212, 2018.
- LORO, M.; VALERO-JIMÉNEZ, C.A.; NOZAWA, S.; MÁRQUEZ, L.M. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *Journal of Arid Environments*, v.85, p.46–55, 2012.
- LOVELOCK, C.E.; WRIGHT, S.F.; CLARK, D.A.; RUESS, R.W. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*, v.92, p.278–287, 2004.
- LUGO, M.A.; MOLINA, M.G.; CRESPO, E.M. Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in bromeliads from South American arid environment. *Symbiosis*, v.47, p.17–21, 2009.
- LUGO, M.A.; MOLINA, M.G.; CRESPO, E.M. Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in bromeliads from South American arid environment. *Symbiosis*, v.47, p.17–21, 2009.
- LUGTENBERG, B.J.J.; CARADUS, J.R.; JOHNSON, L.J. Fungal endophytes for sustainable crop production. *FEMS Microbiology Ecology*, v.92, 2016.
- LUGTENBERG, B.J.J.; MALFANOVA, N.; KAMILOVA, F.; BERG, G. Plant Growth Promotion by Microbes. In: BRUIJN, F.J. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. Hoboken - NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p.559–573.
- LUO, J.; WALSH, E.; BLYSTONE, D.; ZHANG, N. Five new *Pseudophialophora* species from grass roots in the oligotrophic pine barrens ecosystem. *Fungal Biology*, v.119, p.1205–1215, 2015.
- MACKENZIE, D.I.; NICHOLS, J.D.; ROYLE, J.A.; POLLOCK, K.H.; BAILEY, L.L.; HINES, J.E. Basic Presence/Absence Situation. In: MACKENZIE, D.I.; NICHOLS, J.D.;

- ROYLE, J.A.; POLLOCK, K.H.; BAILEY, L.L.; HINES, J.E. Occupancy Estimation and Modeling. Academic Press, 2018. p.115–215.
- MALIK, Z.; AHMAD, M.; ABASSI, G.H.; DAWOOD, M.; HUSSAIN, A.; JAMIL, M. Agrochemicals and Soil Microbes: Interaction for Soil Health. In: HASHMI, M.Z.; KUMAR, V.; VARMA, A. Xenobiotics in the Soil Environment: Monitoring, Toxicity and Management. Soil Biology. Cham: Springer International Publishing, 2017. p.139–152.
- MANDYAM, K.; FOX, C.; JUMPPONEN, A. Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. *Mycorrhiza*, v.22, p.109–119, 2012.
- MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Unraveling the Dark Septate Endophyte Functions: Insights from the *Arabidopsis* Model. In: VERMA, V.C.; GANGE, A.C. Advances in Endophytic Research. New Delhi: Springer India, 2014. p.115–141.
- MANDYAM, K.; LOUGHIN, T.; JUMPPONEN, A. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia*, v.102, p.813–821, 2010.
- MANDYAM, K.G.; JUMPPONEN, A. Mutualism parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Frontiers in Microbiology*, v.5, 2015.
- MANDYAM, K.G.; ROE, J.; JUMPPONEN, A. *Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. *Fungal Biology*, v.117, p.250–260, 2013.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; MARTÍNEZ-JAIMES, P.; SÁNCHEZ, D.G.; PEÑACHORA, G.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, V.M. Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. v.42, p.11, 2015.
- MARTINS, T.D.; MENTEN, J.O.M.; SANGUINO, Á. Fungos associados às sementes (Cariopses) de cana-de-açúcar: métodos para detecção, incidência e relação entre incidência fúngica e ambiente de produção das sementes. *Summa Phytopathologica*, v.35, p.173–178, 2009.
- MATSUOKA, S. Identificação de Doenças da Cana-de-Açúcar e Medidas de Controle. In: SANTOS, F.; BORÉM, A. Cana-de-açúcar: do Plantio à Colheita. Lavras-MG, UFLA, 2012. p.89-115.
- MAYERHOFER, M.S.; KERNAGHAN, G.; HARPER, K.A. The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, v.23, p.119–128, 2013.
- MEDINA, P.F.; TANAKA, M.A. DE S.; PARISI, J.J.D. Sobrevivência de fungos associados ao potencial fisiológico de sementes de triticales (*X. tritico-secale* Wittmack) durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v.31, p.10, 2009.
- MENDES, R. Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar, 2008. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MOHAMED MAHMOUD, F.; KRIMI, Z.; MACIÁ-VICENTE, J.G.; BRAHIM ERRAHMANI, M.; LOPEZ-LLORCA, L.V. Endophytic fungi associated with roots of date palm (*Phoenix dactylifera*) in coastal dunes. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.34, p.116–120, 2017.
- MOREIRA, S.D.; FRANÇA, A.C.; GRAZZIOTTI, P.H.; LEAL, F.D.S.; SILVA, E. DE B.; Arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus doses on coffee growth under a non-sterile soil. *Revista Caatinga*, v.32, p.72–80, 2019.

- MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T.L.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER, A.A. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, v.24, p.1757–1764, 2008.
- MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T.L.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER, A.A. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, v.24, p.1757–1764, 2008.
- MUANGTHONG, A.; YOUPENSUK, S.; RERKASEM, B. Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Tropical Life Sciences Research*, v.26, p.41–51, 2015.
- MUKHERJEE, P.K.; HORWITZ, B.A.; SINGH, U.S.; MUKHERJEE, M.; SCHMOLL, M. *Trichoderma* in Agriculture, Industry and Medicine: An Overview. In: Mukherjee, P.K.; Horwitz, B.A.; Singh, U.S.; Mukherjee, M.; Schmoll, M. *Trichoderma: biology and applications*. CABI International, 2013. p.1-9.
- MULAW, T.; DRUZHININA, I.; KUBICEK, C.; ATANASOVA, L. Novel Endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from Healthy *Coffea arabica* Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomycosis. *Diversity*, v.5, p.750–766, 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473–497, 1962.
- NAKASONE, K.K. Reexamination of *Odontia sacchari*, *O. saccharicola*, and *Corticium granulare*. *Karstenia The Journal of the Finnish Mycological Society*, v.40, p.111–116, 2000.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v.170, p.265–270, 1999.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 7 out. 2019.
- NETO, R.F.; SILVA JÚNIOR, G.B. DA; ROCHA, L.F. DA; CAVALCANTE, Í.H.L.; BECKMANN-CAVALCANTE, M.Z. Características biométricas de mudas de castanha-do-gurguéia em função de calagem e NPK. *Revista Ciência Agronômica*, v.42, p.940–949, 2011.
- NEWSHAM, K.K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, v.190, p.783–793, 2011.
- NOGUEIRA, A.R. DE A.; SOUZA, G.B. DE. Manual de laboratórios solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos-SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 334p.
- NOVAIS, C.B.; BORGES, W.L.; SILVA, G.A.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J. Técnicas Básicas em Micorrizas Arbusculares. Lavras: UFLA, 2017. 130p.
- OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; MÄDER, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Impact of Land Use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.2816–2824, 2003.
- OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; MÄDER, P.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v.134, p.257–268, 2009.
- OKANSEN, J.; BLANCHET, F.G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.;

- STEVENS, M.H.H.; SZOECES, E.; WAGNER, H. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6.
- PARK, Y.-H.; CHANDRA MISHRA, R.; YOON, S.; KIM, H.; PARK, C.; SEO, S.-T.; BAE, H. Endophytic *Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens. *Journal of Ginseng Research*, v.43, p.408–420, 2019.
- PATREZE, C.M.; NOVAIS, C.B.D.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J. Evolução do uso das técnicas moleculares nos estudos filogenéticos e das comunidades de fungos micorrízicos arbusculares. In: SEVERIANO, E. DA C.; MORAIS, M.F.; PAULA, A.M. Tópicos em Ciência do Solo. Viçosa - MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2019. p.649–693.
- PAUL, D.; PARK, K.S. Identification of Volatiles Produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a Fungal Biocontrol Agent That Promotes Plant Growth. *Sensors*, v.13, p.13969–13977, 2013.
- PEREIRA, M.G.; VALLADARES, G.S.; SOUZA, J.M.P.F.; PÉREZ, D.V.; ANJOS, L.H.C. DOS. Estimativa da acidez potencial pelo método do pH SMP em solos do estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.22, p.159–162, 1998.
- PETERSON, B.G.; CARL, P.; BOUDT, K.; BENNETT, R.; ULRICH, J.; ZIVOT, E.; CORNILLY, D.; HUNG, E.; LESTEL, M.; BALKISSOON, K.; WUERTZ, D. PerformanceAnalytics: Econometric Tools for Performance and Risk Analysis.
- PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.M.; LEMANCEAU, P.; PUTTEN, W.H. VAN DER. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, v.11, p.789–799, 2013.
- PREMA SUNDARA VALLI, P.; MUTHUKUMAR, T. Dark Septate Root Endophytic Fungus *Nectria haematococca* Improves Tomato Growth under Water Limiting Conditions. *Indian Journal of Microbiology*, v.58, p.489–495, 2018.
- PRINGLE, A.; BEVER, J.D. Divergent phenologies may facilitate the coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi in a North Carolina grassland. *American Journal of Botany*, v.89, p.1439–1446, 2002.
- PRIYADHARSINI, P.; MUTHUKUMAR, T. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. *Fungal Ecology*, v.27, p.69–77, 2017.
- PUPIN, B.; FREDDI, O. DA S.; NAHAS, E. Microbial alterations of the soil influenced by induced compaction. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.33, p.1207–1213, 2009.
- QUAEDVLIEG, W.; KEMA, G.H.J.; GROENEWALD, J.Z.; VERKLEY, G.J.M.; SEIFBARGHI, S.; RAZAVI, M.; MIRZADI GOHARI, A.; MEHRABI, R.; CROUS, P.W. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v.26, p.57–69, 2011.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RAJA, H.A.; MILLER, A.N.; PEARCE, C.J.; OBERLIES, N.H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, v.80, p.756–770, 2017.

- RAMOS, S.M.S.; CRUZ, R.; BARBOSA, R. DO N.; MACHADO, A.R.; COSTA, A.F. DA; MOTTA, C.M. DE S.; OLIVEIRA, N.T. DE. *Penicillium* and *Talaromyces* Communities of Sugarcane Soils (*Saccharum officinarum* L.): Ecological and Phylogenetic Aspects. *Journal of Agricultural Science*, v.10, p.335, 2018.
- REHNER, S.A.; SAMUELS, G.J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, v.98, p.625–634, 1994.
- REIS, V.M.; PAULA, M.A. DE; DÖBEREINER, J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.34, p.1933–1941, 1999.
- REYES, H.A.; FERREIRA, P.F.A.; SILVA, L.C.; COSTA, M.G. DA; NOBRE, C.P.; GEHRING, C. Arbuscular mycorrhizal fungi along secondary forest succession at the eastern periphery of Amazonia: Seasonal variability and impacts of soil fertility. *Applied Soil Ecology*, v.136, p.1–10, 2019.
- RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, G.M.D.; MOSQUEIRA, C.A.; BARAÚNA, A.C.; VITAL, M.J.S.; SILVA, K.; ZILLI, J.É. Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos “dark septate” a partir de plantas de arroz. *REVISTA AGRO@MBIENTE ON-LINE*, v.5, p.97–105, 2011.
- RIDESA. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. Curitiba: RIDESA, 2010. 136p.
- RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, v.84, p.355–363, 2004.
- RILLIG, M.C.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W.F.; TORN, M.S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil*, v.233, p.167–177, 2001.
- RODRIGUEZ, R.J.; JR, J.F.W.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, v.182, p.314–330, 2009.
- ROMÃO-DUMARESQ, A.S.; DOURADO, M.N.; FÁVARO, L.C. DE L.; MENDES, R.; FERREIRA, A.; ARAÚJO, W.L. Diversity of Cultivated Fungi Associated with Conventional and Transgenic Sugarcane and the Interaction between Endophytic *Trichoderma virens* and the Host Plant. *PLOS ONE*, v.11, 2016.
- ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A.D. Cana de açúcar: Interpretação da análise. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_83_22122006154841.html>. Acesso em: 23 dez. 2019.
- ROTHEN, C.; MIRANDA, V.; ARANDA-RICKERT, A.; FRACCHIA, S.; RODRÍGUEZ, M.A. Characterization of dark septate endophyte fungi associated with cultivated soybean at two growth stages. *Applied Soil Ecology*, v.120, p.62–69, 2017.
- RUDORFF, B.F.T.; AGUIAR, D.A.; SILVA, W.F.; SUGAWARA, L.M.; ADAMI, M.; MOREIRA, M.A. Studies on the Rapid Expansion of Sugarcane for Ethanol Production in São Paulo State (Brazil) Using Landsat Data. *Remote Sensing*, v.2, p.1057–1076, 2010.
- RUOTSALAINEN, A.L. Dark Septate Endophytes (DSE) in Boreal and Subarctic Forests. In: PIRTILÄ, A.M.; FRANK, A.C. *Endophytes of Forest Trees*. Cham: Springer International Publishing, 2018. v.86p.105–117.

- RUSSO, M.L.; PELIZZA, S.A.; CABELLO, M.N.; STENGLEIN, S.A.; VIANNA, M.F.; SCORSETTI, A.C. Endophytic fungi from selected varieties of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and corn (*Zea mays* L.) grown in an agricultural area of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, v.48, p.154–160, 2016.
- SALES, L.R. Inoculação em campo de fungos micorrízicos arbusculares nativos na produtividade e qualidade da cana-de-açúcar. 2018. 80p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v.78, p.141–173, 2014.
- SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.; BILLS, G.F.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, Í. Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*, v.5, p.289–297, 2012.
- SÁNCHEZ-CAÑIZARES, C. Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, p.9, 2017.
- SANTOS, G.R. DOS; TSCHOEKE, P.H.; SILVA, L. DE G.; SILVEIRA, M.C.A.C. DA; REIS, H.B.; BRITO, D.R.; CARLOS, D. DE S. Sanitary analysis, transmission and pathogenicity of fungi associated with forage plant seeds in tropical regions of Brazil. *Journal of Seed Science*, v.36, p.54–62, 2014.
- SANTOS, S.G. DOS; SILVA, P.R.A. DA; GARCIA, A.C.; ZILLI, J.É.; BERBARA, R.L.L. Dark septate endophyte decreases stress on rice plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.48, p.333–341, 2017.
- SCERVINO, J.M.; GOTTLIEB, A.; SILVANI, V.A.; PÉRGOLA, M.; FERNÁNDEZ, L.; GODEAS, A.M. Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biology and Biochemistry*, v.41, p.1753–1756, 2009.
- SCHLEMPER, T.R.; VEEN, J.A. VAN; KURAMAE, E.E. Co-Variation of Bacterial and Fungal Communities in Different Sorghum Cultivars and Growth Stages is Soil Dependent. *Microbial Ecology*, v.76, p.205–214, 2018.
- SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; CONSORTIUM, F.B. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.109, p.6241–6246, 2012.
- SCHOUTEDEN, N.; WAELE, D.D.; PANIS, B.; VOS, C.M. Arbuscular Mycorrhizal Fungi for the Biocontrol of Plant-Parasitic Nematodes: A Review of the Mechanisms Involved. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1280, 2015.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. What are Endophytes? In: SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. *Microbial Root Endophytes*. *Soil Biology*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p.1–13.
- SENTELHAS, P.C.; MARIN, F.R.; FERREIRA, A.S.; SÁ, E.J.S. Banco de Dados Climáticos do Brasil. Município Rancheira - SP. Disponível em: <<https://www.cnpem.br/projetos/bdclima/balanco/resultados/sp/434/balanco.html>>. Acesso em: 5 fev. 2019.

- SHANKAR NAIK, B.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y.L. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. *Fungal Ecology*, v.1, p.89–93, 2008.
- SHEIKH, M. Preliminary Investigation Suggests Soilborne *Rhizoctonia solani* Infecting Sugarcane in Uttar-Pradesh India. *Advances in Plants & Agriculture Research*, v.3, 2016.
- SHRESTHA, P.; SZARO, T.M.; BRUNS, T.D.; TAYLOR, J.W. Systematic Search for Cultivable Fungi That Best Deconstruct Cell Walls of *Miscanthus* and Sugarcane in the Field. *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, p.5490–5504, 2011.
- SILVA BARROS, T.H. DA; ARAUJO PEREIRA, A.P. DE; SOUZA, A.J. DE; RIBEIRO, N.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; COELHO, R.D. Influence of Sugarcane Genotype and Soil Moisture Level on the Arbuscular Mycorrhizal Fungi Community. *Sugar Tech*, v.21, p.505–513, 2019.
- SILVA, I.R. DA; MELLO, C.M.A. DE; FERREIRA NETO, R.A.; SILVA, D.K.A. DA; MELO, A.L. DE; OEHL, F.; MAIA, L.C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi along an environmental gradient in the Brazilian semiarid. *Applied Soil Ecology*, v.84, p.166–175, 2014.
- SILVANI, V.A.; FRACCHIA, S.; FERNÁNDEZ, L.; PÉRGOLA, M.; GODEAS, A. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology and Biochemistry*, v.40, p.1259–1263, 2008.
- SIMON, J.-C.; MARCHESI, J.R.; MOUGEL, C.; SELOSSE, M.-A. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome*, v.7, p.5, 2019.
- SINGH, A.; SARMA, B.K.; SINGH, H.B.; UPADHYAY, R.S. Trichoderma: A Silent Worker of Plant Rhizosphere. In: GUPTA, V.K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R.S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M.G. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier, 2014. p.533–542.
- SINGH, P.K.; SINGH, M.; TRIPATHI, B.N. Glomalin: an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein. *Protoplasma*, v.250, p.663–669, 2013.
- SIVAKUMAR, N. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. *Annals of Microbiology*, v.63, p.151–160, 2013.
- SMITH, C.R.; BLAIR, P.L.; BOYD, C.; CODY, B.; HAZEL, A.; HEDRICK, A.; KATHURIA, H.; KHURANA, P.; KRAMER, B.; MUTERSPAW, K.; PECK, C.; SELLS, E.; SKINNER, J.; TEGELER, C.; WOLFE, Z. Microbial community responses to soil tillage and crop rotation in a corn/soybean agroecosystem. *Ecology and Evolution*, v.6, p.8075–8084, 2016.
- SOUSA, D.M.G.; MIRANDA, L.N.; OLIVEIRA, S.A. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V.; V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. *Fertilidade do Solo*. Viçosa: SBCS, 2007. p.205–274.
- SOUSA, G.P.D. Caracterização molecular e enzimática de fungos endofíticos de cana-de-açúcar e seu potencial para desconstrução de biomassa lignocelulósica. 2017. 120p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Tocantins.
- SOUZA, R.S.C. DE; OKURA, V.K.; ARMANHI, J.S.L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; SILVA, M.J. DA; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; ARAÚJO, L.M. DE; VERZA, N.C.; BAGHERI, H.C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*, v.6, p.28774, 2016.

- SPAGNOLETTI, F.N.; TOBAR, N.E.; FERNÁNDEZ DI PARDO, A.; CHIOCCHIO, V.M.; LAVADO, R.S. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Applied Soil Ecology*, v.111, p.25–32, 2017.
- STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. In: GUPTA, V.K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R.S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M.G. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier, 2014. p.415–428.
- STOKHOLM, M.S.; WULFF, E.G.; ZIDA, E.P.; THIO, I.G.; NÉYA, J.B.; SOALLA, R.W.; GŁAZOWSKA, S.E.; ANDRESEN, M.; TOPBJERG, H.B.; BOELT, B.; LUND, O.S. DNA barcoding and isolation of vertically transmitted ascomycetes in sorghum from Burkina Faso: *Epicoccum sorghinum* is dominant in seedlings and appears as a common root pathogen. *Microbiological Research*, v.191, p.38–50, 2016.
- STÜRMER, S.L.; BEVER, J.D.; MORTON, J.B. Biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota): a phylogenetic perspective on species distribution patterns. *Mycorrhiza*, v.28, p.587–603, 2018.
- STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Fungos Micorrízicos. In: MOREIRA, F.M.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.; STÜRMER, S.L. *O ecossistema solo. Componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal*. Lavras: UFLA, 2013. p.289–310.
- SU, L.; NIU, Y.-C. Multilocus phylogenetic analysis of *Talaromyces* species isolated from cucurbit plants in China and description of two new species, *T. cucurbitiradicus* and *T. endophyticus*. *Mycologia*, v.110, p.375–386, 2018.
- SU, Z.-Z.; MAO, L.-J.; LI, N.; FENG, X.-X.; YUAN, Z.-L.; WANG, L.-W.; LIN, F.-C.; ZHANG, C.-L. Evidence for Biotrophic Lifestyle and Biocontrol Potential of Dark Septate Endophyte *Harpophora oryzae* to Rice Blast Disease. *PLoS ONE*, v.8, 2013.
- SU-HAN, N.H.; SONGKUMARN, P.; NUANKAEW, S.; BOONYUEN, N.; PIASAI, O. Diversity of sporulating rice endophytic fungi associated with Thai rice cultivars (*Oryza sativa* L.) cultivated in Suphanburi and Chainat Provinces, Thailand. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, v.9, p.1–14, 2019.
- SUNITHAKUMARI, K.; PADMA DEVI, S.N.; VASANDHA, S. Zinc Solubilizing Bacterial Isolates from the Agricultural Fields of Coimbatore, Tamil Nadu, India. *Current Science*, v.110, N.2, p.196-205, 2016.
- TADYCH, M.; WHITE, J.F. Endophytic Microbes. In: SCHMIDT, T.M. *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, 2019, p.123-126.
- TAYLOR, T.N.; KRINGS, M.; TAYLOR, E.L. Ascomycota. In: TAYLOR, T.N.; KRINGS, M.; TAYLOR, E.L. *Fossil Fungi*. Academic Press, 2015. p.129–171.
- TAYUNG, K.; SARKAR, M.; BARUAH, P. Endophytic fungi occurring in *Ipomoea carnea* tissues and their antimicrobial potentials. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.55, p.653–660, 2012.
- TORRECILLAS, E.; ALGUACIL, M.M.; ROLDÁN, A. Host Preferences of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing Annual Herbaceous Plant Species in Semiarid Mediterranean Prairies. *Applied and Environmental Microbiology*, v.78, p.6180–6186, 2012.
- TRUBER, P.V.; FERNANDES, C. Arbuscular mycorrhizal fungal communities and soil aggregation as affected by cultivation of various crops during the sugarcane fallow period. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.38, p.415–422, 2014.

- TURNER, T.R.; JAMES, E.K.; POOLE, P.S. The plant microbiome. *Genome Biology*, v.14, p.209, 2013.
- VAN GEEL, M.; DE BEENHOUWER, M.; LIEVENS, B.; HONNAY, O. Crop-specific and single-species mycorrhizal inoculation is the best approach to improve crop growth in controlled environments. *Agronomy for Sustainable Development*, v.36:37, p.1-10, 2016.
- VANDENKOORNHUYSE, P.; BALDAUF, S.L.; LEYVAL, C.; STRACZEK, J.; YOUNG, J.P.W. Extensive Fungal Diversity in Plant Roots. *Science*, v.295, p.2051–2051, 2002.
- VASCONCELOS, A.C.M.; CASAGRANDE, A.A. Fisiologia do sistema radicular. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. Cana-de-açúcar. Campinas: IAC, 2010. p.79–97.
- VEGA, F.E.; SIMPKINS, A.; AIME, M.C.; POSADA, F.; PETERSON, S.W.; REHNER, S.A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, A.E. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, v.3, p.122–138, 2010.
- VELDRE, V.; ABARENKOV, K.; BAHRAM, M.; MARTOS, F.; SELOSSE, M.-A.; TAMM, H.; KÖLJALG, U.; TEDERSOO, L. Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecology*, v.6, p.256–268, 2013.
- VELOSO, C.A.C.; BOTELHO, S.M.; LOPES, A. DE M.; CARVALHO, E.J.M. Nutrição Mineral e Adubação da Cultura do Arroz de Sequeiro. Belém - PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 29p.
- VERGARA, C.; ARAUJO, K.E.C.; ALVES, L.S.; SOUZA, S.R. DE; SANTOS, L.A.; SANTA-CATARINA, C.; SILVA, K. DA; PEREIRA, G.M.D.; XAVIER, G.R.; ZILLI, J.É. Contribution of dark septate fungi to the nutrient uptake and growth of rice plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.49, p.67–78, 2018.
- VERGARA, C.; ARAUJO, K.E.C.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BALIEIRO, F. DE C.; MEDEIROS, P.S.; SANTOS, L.A.; XAVIER, G.R.; ZILLI, J.E. Dark Septate Endophytic Fungi Help Tomato to Acquire Nutrients from Ground Plant Material. *Frontiers in Microbiology*, v.8, 2017.
- VIARO, H.P.; SILVA, J.J. DA; SOUZA FERRANTI, L. DE; BORDINI, J.G.; MASSI, F.P.; FUNGARO, M.H.P. The first report of *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola* and *A. pseudocaelatus* in Brazilian corn kernels. *International Journal of Food Microbiology*, v.243, p.46–51, 2017.
- VIEIRA, L.C.; SILVA, D.K.A. DA; SILVA, I.R. DA; GONÇALVES, C.M.; ASSIS, D.M.A. DE; OEHL, F.; SILVA, G.A. DA. Ecological aspects of arbuscular mycorrhizal fungal communities in different habitat types of a Brazilian mountainous area. *Ecological Research*, v.34, p.182–192, 2019.
- VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus species*. *Journal of Bacteriology*, v.172, p.4238–4246, 1990.
- VINALE, F.; NICOLETTI, R.; LACATENA, F.; MARRA, R.; SACCO, A.; LOMBARDI, N.; ERRICO, G. D'; DIGILIO, M.C.; LORITO, M.; WOO, S.L. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus*. *Natural Product Research*, v.31, p.1778–1785, 2017.

- VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R.A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, v.78, p.343–371, 2014.
- VISWANATHAN, R.; BALAJI, C.G.; SELVAKUMAR, R.; MALATHI, P.; RAMESH SUNDAR, A.; PRASANTH, C.N.; CHHABRA, M.L.; PARAMESWARI, B. Epidemiology of *Fusarium* Diseases in Sugarcane: A New Discovery of Same *Fusarium sacchari* Causing Two Distinct Diseases, Wilt and Pokkah Boeng. *Sugar Tech*, v.19, p.638–646, 2017.
- WANG, M.; LIU, F.; CROUS, P.W.; CAI, L. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v.39, p.118–142, 2017.
- WANG, X.; RADWAN, M.M.; TARÁWNEH, A.H.; GAO, J.; WEDGE, D.E.; ROSA, L.H.; CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. Antifungal Activity against Plant Pathogens of Metabolites from the Endophytic Fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.61, p.4551–4555, 2013.
- WANG, X.W.; BAI, F.Y.; BENSCH, K.; MEIJER, M.; SUN, B.D.; HAN, Y.F.; CROUS, P.W.; SAMSON, R.A.; YANG, F.Y.; HOUBRAKEN, J. Phylogenetic re-evaluation of *Thielavia* with the introduction of a new family Podosporaceae. *Studies in Mycology, Taxonomy of Industrially Important Fungi*. v.93, p.155–252, 2019.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal IRNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. *PCR Protocols*. San Diego: Academic Press, 1990. p.315–322.
- WILLIAMS, A.; MANOHARAN, L.; ROSENSTOCK, N.P.; OLSSON, P.A.; HEDLUND, K. Long-term agricultural fertilization alters arbuscular mycorrhizal fungal community composition and barley (*Hordeum vulgare*) mycorrhizal carbon and phosphorus exchange. *New Phytologist*, v.213, p.874–885, 2017.
- WONG, P.T.W.; DONG, C.; MARTIN, P.M.; SHARP, P.J. Fairway patch - a serious emerging disease of couch (syn. bermudagrass) [*Cynodon dactylon*] and kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) turf in Australia caused by *Phialocephala bamuru* P.T.W. Wong & C. Dong sp. nov. *Australasian Plant Pathology*, v.44, p.545–555, 2015.
- XIANG, D.; VERBRUGGEN, E.; HU, Y.; VERESOGLOU, S.D.; RILLIG, M.C.; ZHOU, W.; XU, T.; LI, H.; HAO, Z.; CHEN, Y.; CHEN, B. Land use influences arbuscular mycorrhizal fungal communities in the farming–pastoral ecotone of northern China. *New Phytologist*, v.204, p.968–978, 2014.
- XU, M.; LI, X.; CAI, X.; LI, X.; CHRISTIE, P.; ZHANG, J. Land use alters arbuscular mycorrhizal fungal communities and their potential role in carbon sequestration on the Tibetan Plateau. *Scientific Reports*, v.7, p.1–11, 2017a.
- XU, X.; CHEN, C.; ZHANG, Z.; SUN, Z.; CHEN, Y.; JIANG, J.; SHEN, Z. The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Chenopodium ambrosioides* revealed by MiSeq sequencing investigation. *Scientific Reports*, v.7, p.1–11, 2017b.
- YAKTI, W.; KOVÁCS, G.M.; VÁGI, P.; FRANKEN, P. Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecology & Diversity*, v.11, p.637–648, 2018.
- YANG, Y.; HE, C.; HUANG, L.; BAN, Y.; TANG, M. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on glomalin-related soil protein distribution, aggregate stability and their relationships

with soil properties at different soil depths in lead-zinc contaminated area. PLoS ONE, v.12, 2017.

YEOH, Y.K.; PAUNGFUO-LONHIENNE, C.; DENNIS, P.G.; ROBINSON, N.; RAGAN, M.A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application: N fertilizer and sugarcane root microbiota. Environmental Microbiology, v.18, p.1338–1351, 2016.

YUAN, Z. -L.; ZHANG, C. -L.; LIN, F. -C.; KUBICEK, C.P. Identity, Diversity, and Molecular Phylogeny of the Endophytic Mycobiota in the Roots of Rare Wild Rice (*Oryza granulate*) from a Nature Reserve in Yunnan, China. Applied and Environmental Microbiology, v.76, p.1642–1652, 2010.

ZAIDI, N.W.; DAR, M.H.; SINGH, S.; SINGH, U.S. *Trichoderma* Species as Abiotic Stress Relievers in Plants. In: GUPTA, V.K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R.S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M.G. Biotechnology and Biology of Trichoderma. Elsevier, 2014. p.515–525.

ZHANG, N.; CAI, G.; PRICE, D.C.; CROUCH, J.A.; GLADIEUX, P.; HILLMAN, B.; KHANG, C.H.; LEBRUN, M.-H.; LEE, Y.-H.; LUO, J.; QIU, H.; VELTRI, D.; WISECAVER, J.H.; ZHU, J.; BHATTACHARYA, D. Genome wide analysis of the transition to pathogenic lifestyles in Magnaporthales fungi. Scientific Reports, v.8, 2018.

ZHANG, Y.; GUO, L.-D.; LIU, R.-J. Survey of arbuscular mycorrhizal fungi in deforested and natural forest land in the subtropical region of Duijiangyan, southwest China. Plant and Soil, v.261, p.257–263, 2004.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology, v.7, p.203–214, 2000.

ZHAO, J.H.; ZHANG, Y.L.; WANG, L.W.; WANG, J.Y.; ZHANG, C.L. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.28, p.2107–2112, 2012.

ZHAO, Y.-P.; LIN, S.; CHU, L.; GAO, J.; AZEEM, S.; LIN, W. Insight into structure dynamics of soil microbiota mediated by the richness of replanted *Pseudostellaria heterophylla*. Scientific Reports, v.6, 2016.

ZHOU, W.; STARR, J.L.; KRUMM, J.L.; SWORD, G.A. The fungal endophyte *Chaetomium globosum* negatively affects both above and belowground herbivores in cotton. FEMS Microbiology Ecology, v.92, p.1-15, 2016.

ZUT. Faculty of Environmental Management and Agriculture. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), Endogone, and Complexipes species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland Disponível em: <<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>>. Acesso em: 16 jan. 2020.

7 CONCLUSÕES GERAIS

A simbiose da cana-de-açúcar com fungos endofíticos septados escuros (DSE) é generalizada na maioria das variedades. Os fungos deste grupo associados à cultura são de ocorrência comum em diferentes regiões, ambientes edáficos e manejos da cana no estado de São Paulo, com ênfase para a presença da espécie *Periconia macrospinosa*.

A inoculação de linhagens isoladas de fungos endofíticos septados escuros (DSE) na mesma espécie vegetal da qual foram isolados, no caso cana-de-açúcar, não garante promoção do crescimento vegetal. Porém, a espécie *P. macrospinosa* foi selecionada como potencial promotora da nutrição vegetal, ao estimular a solubilização de Zn e a absorção de P em plantas de arroz e cana.

A variedade de cana-de-açúcar RB966928 no estado de São Paulo apresenta uma comunidade de fungos endofíticos radiculares cultiváveis de elevada riqueza e diversidade de espécies, a maioria composta por ascomicetos, dominada pelos gêneros *Fusarium* e *Periconia* e com forte presença do gênero *Trichoderma*, ou seja, grupos potencialmente patogênicos, promotores do crescimento e com capacidade de controle biológico.

Não se obteve relação da presença de espécies fúngicas endofíticas e as características edáficas, sugerindo que a composição da comunidade independa dos fatores edáficos, ou que a amostragem tenha que ser mais extensa, inclusive pela avaliação do acúmulo de espécies, que mostrou um esforço amostral insuficiente para esse grupo tão diverso. De forma contrária, a composição da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) avaliada pela morfologia dos esporos foi influenciada pelo pH, a acidez potencial e teores de P, K e Al no solo e a curva de acúmulo de espécie mostrou um esforço amostral suficiente para esse grupo fúngico. A variedade RB966928 no estado de São Paulo apresenta uma riqueza de espécies de Glomeromycotas moderadamente elevada e diversa, com equilíbrio entre espécies dominantes, comuns e raras, sendo dominada pelas espécies *Acaulospora mellea*, *A. scrobiculata*, *Sieverdingia tortuosa*, *Glomus macrocarpum*, *G. microaggregatum* e *Racocetra pérsica*.

A cana-de-açúcar, entre um grupo diverso de fungos endofíticos presentes, é colonizada (visualmente por microscopia) tanto por DSE, quanto por FMAs, de forma que a co-existência de ambas simbioses nas raízes sugere sinergismo e não competição entre estes grupos fúngicos.

8 ANEXOS

Anexo 1. Listagem dos 391 isolados de fungos endofíticos isolados de raízes de cana-de-açúcar variedade RB966928 em 24 pontos de amostragem tomados entre maio e junho de 2017 no estado de São Paulo, Brasil.

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
1	A127	Ref 031	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
1	A128	Ref 242	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
1	A129	Ref 243	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
1	A130	Ref 188	Helotiales	Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)
1	A131	Ref 240	Helotiales	Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)
1	A132	Ref 189	Helotiales	Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)
1	A133	Ref 241	Helotiales	Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)
1	A134	Ref 191	Helotiales	Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)
1	A135	Ref 192	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 2
1	A136	Ref 190	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
1	A137	Ref 140	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
1	A138	Ref 024	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
1	A139	Ref 139	Coniochaetales	<i>Coniochaeta decumbens</i> (J.F.H. Beyma) Z.U. Khan, Gené & Guarro (2013)
1	A140	Ref 057	Magnaporthales*	Magnaporthales sp. 2
1	A141	Ref 237	Sordariales	Chaetomiaceae sp
1	A142	Ref 238	Sordariales	Chaetomiaceae sp
1	A143	Ref 187	Sordariales	Chaetomiaceae sp
1	A144	Ref 016	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
1	A145	Ref 137	—	Não identificado
1	A146	Ref 239	—	Não identificado
1	A147	Ref 138	—	Não identificado
1	A148	Ref 032	—	Não identificado
2	A149	Ref 142	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 2
2	A150	Ref 193	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
2	A151	Ref 244	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
2	A152	Ref 141	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
2	A153	Ref 194	—	Não identificado
3	A154	Ref 197	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A155	Ref 246	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A156	Ref 129	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A157	Ref 247	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A158	Ref 250	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A159	Ref 130	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A160	Ref 252	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A161	Ref 254	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
3	A162	Ref 255	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A163	Ref 200	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A164	Ref 259	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
3	A165	Ref 248	Pleosporales	Pleosporales sp. 2 (Ascomycota sp. 2)
3	A166	Ref 404	Pleosporales	Pleosporales sp. 2 (Ascomycota sp. 2)
3	A167	Ref 143	Hypocreales	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier (1906)
3	A168	Ref 253	Hypocreales	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier (1906)
3	A169	Ref 017	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 1
3	A170	Ref 033	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
3	A171	Ref 251	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
3	A172	Ref 144	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
3	A173	Ref 401	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
3	A174	Ref 196	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 1
3	A175	Ref 035	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
3	A176	Ref 195	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A177	Ref 245	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A178	Ref 405	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A179	Ref 249	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A180	Ref 400	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A181	Ref 199	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A182	Ref 034	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A183	Ref 131	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A184	Ref 256	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 1
3	A185	Ref 198	—	Não identificado
3	A186	Ref 257	—	Não identificado
3	A187	Ref 258	—	Não identificado
3	A188	Ref 025	—	Não identificado
4	A189	Ref 260	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
4	A190	Ref 261	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
4	A191	Ref 132	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
4	A192	Ref 263	Diaporthales	<i>Phaeocytostroma ambiguum</i> (Mont.) Petr. (1927)
4	A193	Ref 145	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
4	A194	Ref 201	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
4	A195	Ref 262	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
5	A196	Ref 266	Hypocreales	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier (1906)
5	A197	Ref 146	Hypocreales	<i>Fusarium annulatum</i> Bugnic. (1952)
5	A198	Ref 264	Hypocreales	<i>Fusarium annulatum</i> Bugnic. (1952)
5	A199	Ref 265	Hypocreales	<i>Fusarium annulatum</i> Bugnic. (1952)
5	A200	Ref 061	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
5	A201	Ref 147	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
5	A202	Ref 026	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
5	A203	Ref 148	Cantharellales	Ceratobasidiaceae sp. (<i>Rhizoctonia/Ceratobasidium</i>)
5	A204	Ref 018	—	Não identificado
6	A205	Ref 202	Eurotiales	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
6	A206	Ref 403	Eurotiales	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
6	A207	Ref 108	Eurotiales	<i>Penicillium</i> sp. 2
6	A208	Ref 204	Hypocreales	<i>Fusarium nygamai</i> L.W. Burgess & Trimboli (1986)
6	A209	Ref 133	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
6	A210	Ref 056	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
6	A211	Ref 036	Hypocreales	Nectriaceae sp.
6	A212	Ref 268	Hypocreales	Nectriaceae sp.
6	A213	Ref 406	Hypocreales	Stachybotryaceae sp.
6	A214	Ref 267	Hypocreales	Stachybotryaceae sp.
6	A215	Ref 149	Agaricales	<i>Marasmiellus</i> sp.
6	A216	Ref 150	Agaricales	<i>Marasmiellus</i> sp.
6	A217	Ref 203	—	Não identificado
6	A218	Ref 037	—	Não identificado
7	A219	Ref 020	Eurotiales	<i>Aspergillus novoparasiticus</i> S.S. Gonçalves, Stchigel, Cano, Godoy-Martinez, Colombo & Guarro (2011)
7	A220	Ref 269	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
7	A221	Ref 402	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
7	A222	Ref 151	—	Não identificado
7	A223	Ref 019	—	Não identificado
8	A224	Ref 207	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
8	A225	Ref 273	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
8	A226	Ref 128	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
8	A227	Ref 205	Pleosporales	Pleosporales sp. 1
8	A228	Ref 270	Pleosporales	Pleosporales sp. 1
8	A229	Ref 208	Hypocreales	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier (1906)
8	A230	Ref 021	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
8	A231	Ref 272	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
8	A232	Ref 152	—	Não identificado
8	A233	Ref 206	—	Não identificado
8	A234	Ref 271	—	Não identificado
9	A235	Ref 038	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
9	A236	Ref 274	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
9	A237	Ref 209	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
9	A238	Ref 210	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
9	A239	Ref 276	Eurotiales	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx (1901)

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
9	A240	Ref 039	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
9	A241	Ref 022	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
9	A242	Ref 277	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
9	A243	Ref 023	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
9	A244	Ref 278	Sordariales	<i>Pseudothielavia terricola</i> (J.C. Gilman & E.V. Abbott) X. Wei Wang & Houbraken (2019)
9	A245	Ref 153	Atractiellales	<i>Atractiellales</i> sp.
9	A246	Ref 275	—	Não identificado
10	A247	Ref 072	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
10	A248	Ref 279	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
10	A249	Ref 090	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
10	A250	Ref 125	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
10	A251	Ref 126	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
10	A252	Ref 073	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
10	A253	Ref 084	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
10	A254	Ref 127	Magnaporthales	Magnaporthaceae sp.
10	A255	Ref 027	—	Não identificado
10	A256	Ref 069	—	Não identificado
11	A257	Ref 155	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
11	A258	Ref 288	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
11	A259	Ref 077	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
11	A260	Ref 289	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
11	A261	Ref 280	Eurotiales	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx (1901)
11	A262	Ref 287	Eurotiales	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
11	A263	Ref 075	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 1
11	A264	Ref 064	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
11	A265	Ref 282	Hypocreales	<i>Fusarium begoniae</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
11	A266	Ref 281	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
11	A267	Ref 283	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
11	A268	Ref 285	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
11	A269	Ref 286	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
11	A270	Ref 094	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
11	A271	Ref 076	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
11	A272	Ref 093	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
11	A273	Ref 284	Magnaporthales	Magnaporthaceae sp.
11	A274	Ref 092	Magnaporthales	Magnaporthaceae sp.
11	A275	Ref 091	—	Não identificado
11	A276	Ref 154	—	Não identificado
11	A277	Ref 156	—	Não identificado
11	A278	Ref 088	—	Não identificado
11	A279	Ref 089	—	Não identificado

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
12	A280	Ref 083	Pleosporales	Pleosporales sp. 2 (Ascomycota sp. 2)
12	A281	Ref 291	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
12	A282	Ref 095	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
12	A283	Ref 080	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
12	A284	Ref 296	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
12	A285	Ref 160	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
12	A286	Ref 124	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
12	A287	Ref 159	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
12	A288	Ref 079	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
12	A289	Ref 294	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
12	A290	Ref 063	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
12	A291	Ref 066	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
12	A292	Ref 096	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
12	A293	Ref 161	Xylariales	<i>Nigrospora</i> sp.
12	A294	Ref 097	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
12	A295	Ref 157	—	Não identificado
12	A296	Ref 158	—	Não identificado
12	A297	Ref 290	—	Não identificado
12	A298	Ref 068	—	Não identificado
12	A299	Ref 292	—	Não identificado
12	A300	Ref 295	—	Não identificado
12	A301	Ref 028	—	Não identificado
13	A302	Ref 123	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
13	A303	Ref 301	Eurotiales	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
13	A304	Ref 297	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
13	A305	Ref 298	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
13	A306	Ref 299	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
13	A307	Ref 302	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
13	A308	Ref 304	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
13	A309	Ref 071	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
13	A310	Ref 303	Hypocreales	Nectriaceae sp.
13	A311	Ref 300	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
13	A312	Ref 122	—	Não identificado
13	A313	Ref 305	—	Não identificado
14	A314	Ref 116	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
14	A315	Ref 117	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
14	A316	Ref 162	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
14	A317	Ref 107	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
14	A318	Ref 118	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
14	A319	Ref 085	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
14	A320	Ref 306	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 2
14	A321	Ref 098	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
14	A322	Ref 087	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
14	A323	Ref 029	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
14	A324	Ref 163	Hypocreales	Hypocreales sp. (Ascomycota sp. 1)
14	A325	Ref 078	—	Não identificado
15	A326	Ref 316	Capnodiales	<i>Cladosporium</i> sp.
15	A327	Ref 112	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A328	Ref 307	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A329	Ref 309	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A330	Ref 310	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A331	Ref 115	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A332	Ref 113	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A333	Ref 111	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A334	Ref 114	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A335	Ref 081	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A336	Ref 109	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A337	Ref 322	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A338	Ref 323	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
15	A339	Ref 317	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
15	A340	Ref 318	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
15	A341	Ref 030	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
15	A342	Ref 320	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 2
15	A343	Ref 324	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
15	A344	Ref 325	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
15	A345	Ref 321	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 4
15	A346	Ref 313	Sordariales	<i>Pseudothielavia terricola</i> (J.C. Gilman & E.V. Abbott) X. Wei Wang & Houbraken (2019)
15	A347	Ref 315	Cantharellales	Ceratobasidiaceae sp. (<i>Rhizoctonia/Ceratobasidium</i>)
15	A348	Ref 312	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
15	A349	Ref 308	—	Não identificado
15	A350	Ref 110	—	Não identificado
15	A351	Ref 311	—	Não identificado
15	A352	Ref 314	—	Não identificado
15	A353	Ref 319	—	Não identificado
15	A354	Ref 164	—	Não identificado
16	A355	Ref 327	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
16	A356	Ref 328	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
16	A357	Ref 331	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
16	A358	Ref 059	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
16	A359	Ref 334	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
16	A360	Ref 336	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
16	A361	Ref 342	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 2
16	A362	Ref 060	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
16	A363	Ref 335	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
16	A364	Ref 326	Magnaporthales	Magnaporthales sp. 1
16	A365	Ref 329	Sordariales	Chaetomiaceae sp
16	A366	Ref 343	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
16	A367	Ref 344	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
16	A368	Ref 345	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
16	A369	Ref 330	—	Não identificado
16	A370	Ref 332	—	Não identificado
16	A371	Ref 333	—	Não identificado
17	A372	Ref 065	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
17	A373	Ref 347	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
17	A374	Ref 349	Eurotiales	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
17	A375	Ref 351	Eurotiales	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
17	A376	Ref 354	Eurotiales	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
17	A377	Ref 051	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
17	A378	Ref 353	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
17	A379	Ref 101	Magnaporthales	<i>Pseudophialophora tarda</i> J. Luo & N. Zhang (2015)
17	A380	Ref 352	Sordariales	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr. (1829)
17	A381	Ref 119	Cantharellales	Ceratobasidiaceae sp. (<i>Rhizoctonia/Ceratobasidium</i>)
17	A382	Ref 086	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A383	Ref 082	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A384	Ref 070	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A385	Ref 074	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A386	Ref 099	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A387	Ref 100	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A388	Ref 167	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A389	Ref 166	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A390	Ref 103	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A391	Ref 104	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
17	A392	Ref 067	—	Não identificado
17	A393	Ref 346	—	Não identificado
17	A394	Ref 165	—	Não identificado
17	A395	Ref 348	—	Não identificado
17	A396	Ref 102	—	Não identificado
17	A397	Ref 350	—	Não identificado

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
17	A398	Ref 355	—	Não identificado
18	A399	Ref 213	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
18	A400	Ref 212	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
18	A401	Ref 172	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
18	A402	Ref 358	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
18	A403	Ref 177	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
18	A404	Ref 040	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A405	Ref 357	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A406	Ref 105	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A407	Ref 173	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A408	Ref 174	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A409	Ref 175	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A410	Ref 053	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A411	Ref 214	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A412	Ref 176	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
18	A413	Ref 211	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
18	A414	Ref 062	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
18	A415	Ref 170	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
18	A416	Ref 041	Hypocreales	Nectriaceae sp.
18	A417	Ref 169	Sordariales	<i>Arcopilus aureus</i> (Chivers) X. Wei Wang & Samson (2016)
18	A418	Ref 052	Sordariales	<i>Arcopilus aureus</i> (Chivers) X. Wei Wang & Samson (2016)
18	A419	Ref 171	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
18	A420	Ref 168	—	Não identificado
18	A421	Ref 356	—	Não identificado
18	A422	Ref 042	—	Não identificado
19	A423	Ref 361	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
19	A424	Ref 362	Pleosporales	<i>Periconia macrospinoso</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
19	A425	Ref 044	Eurotiales	<i>Penicillium javanicum</i> J.F.H. Beyma (1929)
19	A426	Ref 043	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
19	A427	Ref 054	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 1
19	A428	Ref 181	Sordariales	Chaetomiaceae sp
19	A429	Ref 215	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
19	A430	Ref 216	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
19	A431	Ref 179	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
19	A432	Ref 218	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
19	A433	Ref 219	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
19	A434	Ref 221	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
19	A435	Ref 222	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
19	A436	Ref 183	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
19	A437	Ref 178	Cantharellales	Ceratobasidiaceae sp. (<i>Rhizoctonia/Ceratobasidium</i>)
19	A438	Ref 217	Cantharellales	Ceratobasidiaceae sp. (<i>Rhizoctonia/Ceratobasidium</i>)
19	A439	Ref 359	—	Não identificado
19	A440	Ref 360	—	Não identificado
19	A441	Ref 136	—	Não identificado
19	A442	Ref 180	—	Não identificado
19	A443	Ref 120	—	Não identificado
19	A444	Ref 182	—	Não identificado
19	A445	Ref 220	—	Não identificado
19	A446	Ref 223	—	Não identificado
20	A447	Ref 186	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
20	A448	Ref 366	Eurotiales	<i>Penicillium</i> sp. 1
20	A449	Ref 185	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A450	Ref 046	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A451	Ref 047	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A452	Ref 363	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A453	Ref 224	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A454	Ref 225	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A455	Ref 364	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A456	Ref 365	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A457	Ref 049	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> sp.
20	A458	Ref 184	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
20	A459	Ref 367	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
20	A460	Ref 050	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
20	A461	Ref 106	Hypocreales	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987)
20	A462	Ref 048	—	Não identificado
20	A463	Ref 368	—	Não identificado
21	A464	Ref 369	Pleosporales	<i>Curvularia</i> sp.
21	A465	Ref 372	Helotiales	Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)
21	A466	Ref 226	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
21	A467	Ref 227	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
21	A468	Ref 228	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
21	A469	Ref 055	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
21	A470	Ref 376	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
21	A471	Ref 374	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 2
21	A472	Ref 375	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 2
21	A473	Ref 230	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 2

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
21	A474	Ref 370	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
21	A475	Ref 371	Agaricales	<i>Marasmius</i> sp. 2
21	A476	Ref 373	—	Não identificado
21	A477	Ref 229	—	Não identificado
22	A478	Ref 380	Chaetothyriales	<i>Rhinocladiella similis</i> de Hoog & Caligorne (2003)
22	A479	Ref 293	Helotiales	Helotiales sp. (<i>Phialocephala/Acephala</i>)
22	A480	Ref 379	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
22	A481	Ref 383	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
22	A482	Ref 387	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
22	A483	Ref 388	Hypocreales	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999)
22	A484	Ref 390	Sordariales	<i>Chaetomium strumarium</i> (J.N. Rai, J.P. Tewari & Mukerji) P.F. Cannon (1986)
22	A485	Ref 121	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A486	Ref 377	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A487	Ref 378	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A488	Ref 231	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A489	Ref 382	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A490	Ref 384	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A491	Ref 385	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A492	Ref 386	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A493	Ref 389	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A494	Ref 232	Sordariales	Chaetomiaceae sp
22	A495	Ref 391	Xylariales	<i>Nigrospora</i> sp.
22	A496	Ref 381	Hymenochaetales	<i>Resinicium saccharicola</i> (Burt) Nakasone (2000)
22	A497	Ref 233	—	Não identificado
22	A498	Ref 340	—	Não identificado
23	A499	Ref 134	Pleosporales	<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebvre & Aar.G. Johnson (1949)
23	A500	Ref 395	Pleosporales	Pleosporales sp. 2 (Ascomycota sp. 2)
23	A501	Ref 392	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 2
23	A502	Ref 236	Hypocreales	<i>Fusarium</i> sp. 3
23	A503	Ref 393	Hypocreales	Nectriaceae sp.
23	A504	Ref 341	Polyporales	<i>Coriolopsis</i> sp.
23	A505	Ref 234	—	Não identificado
23	A506	Ref 235	—	Não identificado
23	A507	Ref 394	—	Não identificado
24	A508	Ref 396	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
24	A509	Ref 399	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
24	A510	Ref 339	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
24	A511	Ref 135	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
24	A512	Ref 058	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
24	A513	Ref 338	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)

Ponto de amostragem	Código do Isolado*	Identificação no isolamento	Ordem:	Nome Científico
24	A514	Ref 337	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
24	A515	Ref 045	Hypocreales	<i>Trichoderma</i> sp. 2
24	A516	Ref 397	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)
24	A517	Ref 398	Hypocreales	<i>Fusarium acutatum</i> Nirenberg & O'Donnell (1998)

*: Códigos referentes à identificação atribuída aos isolados quando depositados na coleção de fungos do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner.