



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**MICROBIOTA ENDOFÍTICA EM RAÍZES DE *Sorghum bicolor* (L.)
MOENCH EM PERNAMBUCO, BRASIL**

**Recife
2018**

RAFAEL JOSÉ VILELA DE OLIVEIRA

**MICROBIOTA ENDOFÍTICA EM RAÍZES DE *Sorghum bicolor* (L.)
MOENCH EM PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Biologia de Fungos.

Orientador: Dr. José Luiz Bezerra (UFRB)

Co-orientador: Dr. Gladstone Alves da Silva (UFPE)

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Oliveira, Rafael José Vilela de

Micobiota endofítica em raízes de *Sorghum bicolor* (L.) Moench em Pernambuco, Brasil/ Rafael José Vilela de Oliveira- 2018.

77 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz Bezerra

Coorientador: Gladstone Alves da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Fungos endofíticos 2. DNA recombinante 3. Gramínea I. Bezerra, José Luiz (orient.) II. Silva, Gladstone Alves da (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-194

RAFAEL JOSÉ VILELA DE OLIVEIRA

**MICROBIOTA ENDOFÍTICA EM RAÍZES DE *Sorghum bicolor* (L.)
MOENCH EM PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 07/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. José Luiz Bezerra Orientador / Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Nadja Santos Vitória / Universidade do Estado da Bahia

Dr. Alexandre Reis Machado / Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra / Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Nildo Tabosa / Instituto Agrônômico de Pernambuco

DEDICATÓRIA:

A Deus e
à minha família
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora que estão sempre ao meu lado.

A minha mãe Ladjane Oliveira e ao meu pai Samuel Oliveira por todo carinho, amor, compreensão e investimento em minha educação.

As minhas queridas avós, meu avô e a todos familiares.

A minha esposa Pamella Ximenes pelo companheirismo, amor e paciência.

A minha querida orientadora emérita, Prof^a Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti, pelos valiosos conhecimentos, amizade, paciência, puxões de orelha, e pela inestimável formação como pessoa e profissional a qual levarei para o resto da vida.

Aos meus orientadores e amigos Prof José Luiz Bezerra e Prof Gladstone Alves da Silva.

Aos meus queridos companheiros do Laboratório: Diogo, Carlos, Rejane, Thalline, Catarina, Camila, Walter, Mayara, Ingrid, Ana e Duda.

Ao meu querido amigo Dr Jadson Bezerra que tanto me ajudou nessa caminhada.

Ao IPA e ao Dr. José Nildo Tabosa pela autorização das coletas.

Ao Dr Josimar pela ajuda nas coletas realizadas em Serra Talhada.

I am very grateful to Dr Kerstin Voigt for the supervision during my doctorate sandwich in Germany. I am also grateful to Dr. Volker Schwartze, Mohamed Hassan, Felicia Adelina Stanford, Caroline Semm and others members (students and technicians) from the Jena Microbial Resource Collection (JMRC) and Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology (Hans-Knöll-Institut-HKI).

Muito obrigado!

RESUMO

Os fungos endofíticos habitam tecidos de plantas sem causar sintomas de doença e podem conferir aos vegetais resistência a doenças e a estresses abióticos, bem como podem favorecer o crescimento das plantas. Este estudo teve como objetivo investigar a diversidade de fungos endofíticos presentes em raízes de *Sorghum bicolor* e a influência da localidade e do período fenológico da planta sobre essa diversidade. Para isso foram coletadas raízes de *S. bicolor* durante o período antes da floração (pré-floração) e depois da floração (pós-floração) em cultivos de sorgo localizados em regiões de Zona da Mata e semiárido no estado de Pernambuco (Brasil). Após assepsia, parte dos fragmentos de raízes foram submetidos a extração de DNA total (independente de cultivo) e parte foi transferido para meios de cultura (MEA) para isolamento dos fungos (dependente de cultivo). Para a construção de bibliotecas de clones e para identificação dos isolados de fungos endofíticos foi amplificada a região ITS do rDNA. Dos 1728 fragmentos de raízes analisados foram encontrados 797 isolados de fungos endofíticos, o que correspondeu a uma taxa de colonização de 46,12%. Dos 800 clones obtidos a partir de PCR direta, 558 sequências foram consideradas viáveis. As sequências foram classificadas em 101 OTUs sendo 68 recuperadas pelo método independente de cultivo, 49 pelo método dependente de cultivo sendo 16 comuns em ambos os métodos. De acordo com análises filogenéticas das sequências recuperadas agruparam-se com Ascomycota, Basidiomycota, Mucorales, Glomerales e Chytridiomycota. As ordens Hypocreales, Eurotiales, Sordariales, Pleosporales e Agaricales tiveram representantes mais frequentemente isolados. A comunidade de fungos endofíticos não foi afetada significativamente pelo período de floração. No entanto a comunidade foi fortemente influenciada pelos diferentes locais de coletas (Zona da Mata e semiárido) e principalmente pelos métodos aplicados no estudo (dependente e independente de cultivo). Trata-se do primeiro estudo que analisa a comunidade de fungos endofíticos em sorgo através de técnicas tradicionais de cultivo e da construção de uma biblioteca de clones.

Palavras-chave: Poaceae. rDNA. Endófitos.

ABSTRACT

Endophytic fungi inhabit plant tissues without causing disease symptoms and may confer on plants resistance to diseases and abiotic stresses as well as may favor the growth of plants. The present study aimed to investigate the diversity of endophytic fungi associated with roots of *Sorghum bicolor*, in addition was observed the influence of the locality and the phenological period of the plant in relation to richness of the fungi associated. For this purpose, *Sorghum bicolor* roots were collected during the period before flowering (pre-flowering) and after flowering (post-flowering) in sorghum crops located in region of the Zona da Mata and semiarid in the states of Pernambuco (Brazil). After sterilization, part of the root fragments were transferred to culture media (PDA) for fungal isolation (culture dependent) and other part was used to perform the total DNA extraction (culture independent). For the construction of clone libraries and identification of the isolates of endophytic fungi, was amplified the region ITS of the rDNA. From 1728 root fragments analyzed, were isolated 797 endophytic fungi, corresponding to a colonization rate of 46.12%. From 800 clones obtained, 558 sequences were considered viable. The sequences were classified into 101 OTUs being 68 recovered by the independent culturing method, 49 by the culture dependent method being 16 common in both methods. According to phylogenetic analyzes of the recovered sequences were pooled with Ascomycota, Basidiomycota, Mucorales, Glomerales and Chytridiomycota. The orders Hypocreales, Eurotiales, Sordariales, Pleosporales and Agaricales had representatives more often isolated. According to phylogenetic analyzes, the recovered sequences (dependent and independent of cultivation) grouped with Ascomycota, Basidiomycota, Mucorales, Glomerales and Chytridiomycota. The endophytic fungi community was not significantly affected by the flowering period. However, the community was strongly influenced by the different collection sites (Zona da Mata and semiarid) and mainly by the methods employed (dependent and independent of cultivation).

Palavras-chave: Poaceae. rDNA. Endophytes.

Lista de figuras	Pag
Figura 1 - Cultivo de <i>Sorghum bicolor</i> no período de pré (A) e pós-floração (B) em Goiana, Pernambuco.	29
Figura 2 Cultivo de <i>Sorghum bicolor</i> no período de pré-floração (A) e pós-floração (B) em Serra Talhada, Pernambuco.	30
Figura 3 - Curva de acumulação de espécies utilizando o método de rarefação das espécies de fungos endofíticos isoladas pelo método dependente de cultivo, coletadas em raízes de <i>Sorghum bicolor</i> nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano.	39
Figura 4 - Diversidade Alfa de espécies de fungos endofíticos, isoladas pelo método dependente de cultivo, em raízes de <i>Sorghum bicolor</i> , coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano, sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.	40
Figura 5: Análises de Redundância entre a distribuição das espécies de fungos endofíticos isoladas pelo método dependente de cultivo, em raízes de <i>Sorghum bicolor</i> , coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano, sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.	41
Figura 6 – Curva de acumulação de espécies utilizando o método de rarefação das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo método independente de cultivo em raízes de <i>Sorghum bicolor</i> , coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano.	42
Figura 7 - Diversidade Alfa de espécies de fungos endofíticos identificadas pelo método independente de cultivo em raízes de <i>Sorghum bicolor</i> , coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano, sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.	43
Figura 8 - Diversidade de Shannon para os fungos endofíticos identificadas pelo método independente de cultivo em raízes de <i>Sorghum bicolor</i> , coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano, sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.	44

- Figura 9** - Análise multidimensional não-métrica (NMDS) das comunidades de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* sob diferentes períodos fenológicos nas regiões da Zona da Mata e semiárido pernambucano. 45
- Figura 10** - Reconstrução filogenética via Neighbour-Joining utilizando sequências do 5.8s rDNA das OTUs (método independente de cultivo) e dos isolados “R” (método dependente de cultivo). 50
- Figura 11** - Reconstrução filogenética a partir de análise bayesiana, utilizando sequências do 5.8s rDNA. Ramos verdes representam espécies recuperadas pelo método de isolamento dependente de cultivo, ramos amarelos representam espécies recuperadas pelo método independente de cultivo e ramos azuis representam espécies recuperadas nos dois métodos. 51
- Figura 12** - Diversidade Alfa de espécies de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* detectadas pelo método dependente e independente de cultivo sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração. 52
- Figura 13** - Riqueza de espécies de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* detectadas pelo método dependente e independente de cultivo nas regiões da Zona da Mata e semiárido pernambucano sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração. 53
- Figura 14** - Análise multidimensional não-métrica (NMDS) das comunidades de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* sob diferentes períodos fenológicos nas regiões da Zona da Mata e semiárido pernambucano. 54
- Figura 15** - Perfil da comunidade de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* com base na riqueza de táxons (por ordem) de acordo com o método (dependente de cultivo), período fenológico (pré e pos-floração) e local de coleta (Zona da Mata e semiárido). 55

Lista de tabelas

Pag.

Tabela 1 - Identificação molecular, frequência absoluta (fa) e relativa (fr) das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo método dependente de cultura (Isolado) e pelo método independente de cultura (OTU), frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos isolados de raízes de *Sorghum bicolor* em Pernambuco

34

Tabela 2 - Fungos endofíticos identificados pelo método dependente de cultura (Isolado) e pelo método independente de cultura (OTU), frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos isolados de raízes de *Sorghum bicolor* em Pernambuco

47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FMA	Fungos micorrízicos arbusculares
MEA	Extrato Malte
ITS	Espaçador transcrito interno
PCR	Reação em cadeia da polimerase
nMDS	Escalonamento multidimensional não métrico
UV	Ultravioleta
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
OTU	Unidade Taxônomica Operacional
rDNA	Ácido desoxiribunocléico ribossomal

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS	15
2.1.1 Conceito e importância dos fungos endofíticos	15
2.1.2 Ocorrência de fungos endofíticos em gramíneas	18
2.1.3. Diversidade de fungos endofíticos utilizando métodos moleculares	21
2.2. O SORGO (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) MOENCH)	23
2.2.1. Classificação, Origem e Importância do Sorgo	23
2.2.2 Variedades de Sorgo	25
2.2.3. Linhagem IPA SF15	26
2.2.4. Fenologia da planta	26
2.2.5. Linhagem IPA SF15	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 ÁREAS DE COLETA	28
3.1.1 Estação Experimental de Itapirema (Goiana)	28
3.1.2 Estação Experimental de Serra Talhada	28
3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	28
3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	29
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA DOS FUNGOS	30
3.5 EXTRAÇÃO DO DNA DAS RAÍZES	30
3.6 AMPLIFICAÇÃO	30
3.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO	31
3.8 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	31
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
4 RESULTADOS	32
4.1 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM RAÍZES DE <i>SORHUM BICOLOR</i>	32
4.2 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POR MÉTODO DEPENDENTE DE CULTIVO (ISOLAMENTO)	38
4.3 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POR MÉTODO INDEPENDENTE DE CULTIVO (ANÁLISE MOLECULAR)	41

4.4 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POR MÉTODO DEPENDENTE (ISOLAMENTO) E INDEPENDENTE DE CULTIVO (ANÁLISE MOLECULAR)	45
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
	74
APÊNDICE A – <i>Pseudophialophora sorghi</i> R.J.V. OLIVEIRA, C.M. GONÇ., G.A. SILVA & J.L. BEZERRA, SP. NOV. (Persoonia 39: 330-331)	

1 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são caracterizados por habitarem tecidos de plantas sem causar sintomas de doença e sem produzir estrutura externa visível (AZEVEDO; ARAUJO, 2007). Esses organismos podem conferir aos vegetais resistência a doenças e a estresses abióticos, bem como podem favorecer o crescimento das plantas (WALLER et al., 2005). Também são produtores de substâncias bioativas (LIM et al., 2010; SELIM et al., 2011) e apresentam atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos (COȘOVEANU et al., 2016; FIERRO-CRUZ et al., 2017; ROCHA et al., 2011; ZHENG et al., 2017). Esses fungos podem ser transmitidos verticalmente, pelas sementes, ou horizontalmente, pela penetração em ferimentos na zona radicular causados pela abrasão das raízes (em crescimento) com o solo, e/ou penetrando a partir de aberturas naturais, tais como estômatos (SAIKKONEN et al., 2004; MARINHO et al., 2005; JOHRI, 2006).

A diversidade de fungos endofíticos tem sido estimada por isolamento e posterior identificação morfológica e molecular das espécies (EL-GENDY et al., 2018; HUANG et al., 2008; THOMAS et al., 2008; VEGA et al., 2010). No entanto, apenas parte desses fungos é recuperada em meio de cultura artificial e espécies não cultivadas ou de crescimento lento podem permanecer desconhecidas devido a limitação desses métodos tradicionais de cultura (HYDE; SOYTONG, 2008; SUN et al., 2012). Para obter uma real imagem da comunidade endófitas, devem ser empregadas culturas tradicionais e técnicas moleculares (SUN et al., 2012). Técnicas como uma abordagem independente da cultura para investigar a diversidade genética e a estrutura populacional dos endófitos tem sido útil para investigar a diversidade genética e a estrutura populacional dos endófitos, especialmente para táxons que não crescem em meios artificiais (KO et al., 2011). Além disso, não há trabalhos no Brasil que relatem a presença de fungos endofíticos em vegetais a partir de métodos moleculares.

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) pertence à família Poaceae e é considerado o quinto cereal mais importante do mundo, em termos de produção e área cultivada (SILVA, 2011), constituindo a base alimentar de mais de 500 milhões de pessoas em mais de 30 países (EMBRAPA, 2007). Em 2012/2013, o consumo mundial de sorgo foi de 54,5 milhões de toneladas (CONAB, 2013). A produção brasileira foi cerca de 1.864 mil toneladas na safra de 2016/2017, sendo os estados da Bahia, Piauí e Ceará os principais produtores do Nordeste, seguidos de Pernambuco, com uma produção de cerca de 1,2 mil toneladas em 4,5 mil hectares plantados (CONAB, 2017a; CONAB, 2017b).

As variedades do sorgo podem ser utilizadas como matéria prima na produção de álcool anidro, colas e tintas, bebidas alcoólicas, extração de açúcar de seus colmos e como alimento humano e animal (RIBAS, 2008). Além disso, o sorgo adapta-se facilmente a situações de déficit hídrico (como as encontradas no semiárido) e às condições de baixa fertilidade dos solos que oferecem maiores riscos a outras culturas (RIBAS, 2010). Para o Nordeste do Brasil, o sorgo surge como uma cultura alternativa, pois as condições de solo e escassez de água são fatores limitantes para a produção da maioria das gramíneas (MENDES, 1986). Nessas condições, culturas como o milho não atingem a produtividade máxima de grãos ou de forragem (MOLINA et al., 2000). Convém salientar que o cultivo de plantas com essas características no semiárido de Pernambuco constitui uma meta fundamental para a ascensão agrícola nessa região (SANTOS et al., 1994).

Estudos da composição da comunidade de fungos endofíticos em sorgo podem contribuir com informações ecológicas, fornecendo subsídios para programas de controle de doenças e pragas além de melhorias no desenvolvimento da planta. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi conhecer a diversidade de fungos endofíticos em raízes sadias de *S. bicolor*, utilizando métodos dependente e independente de cultivo, durante os períodos de pré e pós-floração em diferentes regiões do estado de Pernambuco.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

2.1.1 Conceito e importância dos fungos endofíticos

Em 1878, o botânico e micologista alemão Heinrich Anton de Bary usou pela primeira vez o termo simbiose no contexto biológico (OULHEN et al., 2016). Além disso, ele discutiu a relação simbiótica entre fungos e plantas, sendo esses fungos conhecidos atualmente como endófitos. Uma característica dessa simbiose é a associação de uma planta com uma espécie ou comunidade de fungos, ou de outros microrganismos (vírus, bactéria e Archaea) (DE BARRY, 1878 APUD OULHEN et al., 2016). Ao longo do tempo várias definições têm sido propostas para classificar os fungos que habitam os tecidos vegetais. Durante vários anos a definição mais aceita foi a de Petrini (1991), que classifica fungos endofíticos como microrganismos que colonizam os tecidos sadios de partes aéreas da planta, em algum momento do seu ciclo de vida, sem lhe causar danos aparentes.

A definição considerada mais completa e atual sobre o conceito de microrganismos endofíticos foi proposta por Azevedo; Araujo (2007) que definiram como endófitos todos os microrganismos que habitam o interior da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis, excluindo micro-organismos que fixam nitrogênio atmosférico e produzem nódulos nas raízes vegetais, bem como os fungos micorrízicos, ambos conceitualmente endofíticos, mas que apresentam características próprias, sendo bem mais estudados que os endofíticos que habitam partes aéreas de plantas. Em 2012, Rai e colaboradores, propuseram o termo "Mycoendophytes" para fungos endófitos.

A distinção entre microrganismos endofíticos, fitopatogênicos e oportunistas é puramente didática. O desequilíbrio dessa harmonia afeta o comportamento de todos os integrantes da comunidade, oferecendo condições para que os fungos oportunistas manifestem o seu potencial patogênico contra o hospedeiro (AZEVEDO et al., 2000; MAKI, 2006). Estima-se que existem aproximadamente 300.000 espécies de plantas no mundo e a maioria dessas espécies abrigam um grande número de fungos endofíticos. Esses fungos são capazes de beneficiar a planta a partir de vários fatores, porém, os mecanismos por trás dessa ação ainda não são totalmente claros (BEGUM; TAMILSELVI, 2016).

Apesar da interação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros ainda ser pouco conhecida e ter passado despercebida durante séculos (REHMAN et al., 2016), nas últimas décadas houve um importante aumento nesses estudos, ocorrendo descobertas de novas relações simbióticas, descrição de novos táxons, e relatos de novos hábitos e habitats para fungos previamente descritos. Estudos demonstram que aproximadamente 80% dos fungos endofíticos isolados possuem capacidade de produzir compostos biologicamente ativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas (SCHULZ; BOYLE, 2005). Além disso, cerca de 51% das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos eram desconhecidas anteriormente (STROBEL, 2003). Fungos endofíticos têm a capacidade de produzir compostos valiosos que podem ser produzidos em larga escala através de processo de fermentação. Atualmente, produtos originários desses fungos têm sido uma alternativa de baixo custo para uso médico, agrícola e industrial (SUDHA et al., 2016).

Alguns endófitos podem liberar compostos com ação antioxidante de grande importância para a indústria de cosméticos (KHIRALLA et al., 2015; STROBEL et al., 2002). Além disso, parte desses organismos podem atuar como fontes para a produção de vários medicamentos (LI et al., 2015), podendo ser uma alternativa de baixo custo (KAUL

et al., 2013) na fabricação de anti-inflamatórios (MISHRA et al., 2013), antidiabéticos (GHEEWALA et al., 2015; WAGENAAR et al., 2000; STROBEL et al., 1997; ZHANG et al., 1999), anticancerígenos (PHARAMAT et al., 2013) e antimicrobianos (BISHT et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Alguns fungos endofíticos conferem a sua planta hospedeira maior resistência à ambientes estressantes (MARINA et al., 2011), contribuindo na tolerância à estresses abióticos como altas e baixas temperaturas, salinidade e seca (HUBBARD, 2014; RODRIGUEZ et al., 2008). Fungos endofíticos também podem promover o crescimento das plantas (BARELLI et al., 2016; KHAN et al., 2009; HAMAYUN et al., 2010) por meio da fixação de nitrogênio, assimilação de fósforo e produção de fito-hormônios (HOFFMAN et al., 2013; KOZYROVSKA et al., 1996; STOLTZFUS et al., 1997; VESSEY et al., 2003). Além disso, algumas espécies podem ser utilizadas no controle biológico de pragas de interesse agrônômico (SUDHA et al., 2016; VIDAL et al., 2015), controle de doenças vegetais (LARRAN et al., 2016; SOUZA et al., 2016) e na proteção contra diferentes patógenos (BACON et al., 2016).

O aumento das pesquisas com fungos endofíticos se deu principalmente após a descoberta do fungo *Taxomyces andreanae*. Esse endófito foi isolado da planta *Taxus brevifolia* e foi capaz de produzir em laboratório a substância anticancerígena “Taxol” em quantidade superior àquela produzida tradicionalmente usando partes do vegetal (RAI et al., 2014). Os fungos em cultura podem ser induzidos a produzir os mesmos compostos obtidos a partir das suas plantas hospedeiras, reduzindo a necessidade de retirada das plantas do seu ambiente natural. Uma fonte microbiana de um produto de alto valor é uma maneira econômica para produzir metabolitos em grande quantidade e, assim, reduzir seu preço de mercado (RAI et al., 2012). Além disso, a utilização desses microrganismos pode ajudar diretamente na preservação da biodiversidade.

Alguns endófitos produzem fitoquímicos que originalmente foram relatados como característica exclusiva da planta hospedeira. Este fato parece demonstrar que a interação genética endófito-hospedeiro têm evoluído ao longo do tempo (KAUL et al., 2013; TAN; ZOU, 2001). Este conceito foi proposto para explicar a razão de *Taxomyces andreanae* produzir a substância anticâncer “Taxol”. Possivelmente ocorreu recombinação genética entre o microrganismo e o hospedeiro ao longo da evolução conjunta dos simbioses (STROBEL, 2006). Durante o longo período de co-evolução, os fungos endofíticos se adaptaram aos seus microambientes de forma gradual a partir de uma possível variação genética. Isso inclui a captação de fragmentos de DNA do vegetal em seus próprios

genomas, bem como a inserção de fragmentos do seu DNA no genoma da planta hospedeira. Essa pode ser uma das explicações para a capacidade de certos fungos endofíticos biossintetizar alguns compostos provenientes de sua planta hospedeira (RAI et al., 2014).

2.1.2 Ocorrência de fungos endofíticos em gramíneas

Devido à importância de muitas espécies de gramíneas, muitos estudos têm sido realizados com intuito de conhecer os seus fungos endofíticos, assim como suas aplicações. Segundo Clay (1990), a simbiose entre endofíticos e gramíneas não deve ser subestimada. Além disso, gramíneas infectadas com endofíticos representam um sistema modelo ideal para abordar questões sobre coevolução, associações patogênicas e o papel da herbivoria na dinâmica da população de plantas.

Inicialmente, pesquisas foram realizadas com intuito de conhecer fungos endofíticos que causam toxicidade em animais que se alimentavam de gramíneas (BACON et al., 1977; FLETCHER; HARVEY, 1981). Segundo Marquez (2012), levantamentos de campo sugerem que, possivelmente, milhares de espécies de fungos comportam-se como endófitos em gramíneas. Saikkonen et al. (2000) examinaram a comunidade de fungos em espécies de gramíneas nativas e de interesse econômico na Finlândia. Avinash et al. (2015) isolaram fungos endofíticos em *Cymbopogon caesius*, uma espécie de gramínea aromática na Índia. Bellgard et al. (2010) investigaram a comunidade endofítica em gramíneas (*Cortaderia selloana* e *C. jubata*) na Nova Zelândia.

Muitas espécies de gramíneas são de grande importância econômica, principalmente na agricultura. Russo et al. (2016) estudaram a comunidade endofítica associada a milho na Argentina. A influência do solo na colonização de fungos endofíticos em raízes de milho e trigo foi reportada por Bokati et al. (2016). Harzallah et al. (2011) avaliaram vários isolados de fungos do trigo (*Triticum durum*), além de selecionar fungos endofíticos para avaliação da sua atividade antimicrobiana, antioxidante e para promoção do crescimento do hospedeiro. Na Turquia, a presença dos fungos endofíticos *Neotyphodium* e *Acremonium* foram investigadas em 16 espécies de *Triticum* (trigo): *T. aestivum*, *T. columnare*, *T. cylindricum*, *T. dichasians*, *T. kotschyi*, *T. popmonococcum*, *T. neglecta*, *T. ovatum*, *T. peregrinum*, *T. recta*, *T. speltoides*, *T. tauschii*, *T. tripsacoides*, *T. triunciale*, *T. turgidum* e *T. umbellulatum* (MARSHALL et al., 1999). Na Argentina, foram identificados 30 gêneros de endófitos a partir de 722 isolados de folhas, caules e grãos de *Triticum aestivum* (LARRAN et al., 2007). Comby et al. (2016) investigaram a

comunidade de fungos endofíticos do trigo com o objetivo de selecionar um agente antagonista contra patógenos desta cultura.

A diversidade de fungos endofíticos têm sido estimadas em vários trabalhos com arroz (*Oryza* spp.). Wang et al. (2015) isolaram 229 fungos endofíticos de *Oryza rufipogon*. Esses fungos apresentaram grande potencial não só para o controle biológico contra fitopatógenos de *O. sativa*, mas também como fonte de novos metabólitos secundários biologicamente ativos (WANG et al., 2015). Dezenove espécies de fungos foram isoladas de *Oryza sativa* na China e testadas como antagonistas in vitro contra fungos patogênicos (NAIK et al., 2009). Tian et al. (2004), trabalhando com raízes e folhas de arroz na China, sugerem que diferenças na composição química do solo podem influenciar a comunidade de endófitos de plantas de arroz. Na Índia, foram relatadas 15 espécies de fungos endofíticos em folhas de *Oryza sativa* durante as estações de inverno e verão (SHANKAR et al., 2010). Cinquenta isolados de fungos endofíticos foram recuperados a partir de *Oryza glumaepatula* coletada na Amazônia brasileira (RIBEIRO et al., 2011).

Na Argentina, fungos endofíticos tem sido relatados em 36 espécies de gramíneas nativas, pertencentes a seis gêneros: *Briza*, *Bromus*, *Festuca*, *Melica*, *Phleum* e *Poa* (IANNONE et al., 2012). AFKHAMI et al. (2012) descreveram a distribuição e abundância de endófitos em 36 gramíneas nativas (ou naturalizadas) na Califórnia. Martin et al. (2015) isolaram 140 fungos em oito diferentes espécies de gramíneas (*Ammophila* sp., *Bromus* sp., *Festuca* sp., *Hordeum* sp., *Phalaris* sp., *Agrostis* sp., *Descampsia* sp. e *Lolium* sp.) em quatro locais diferentes ao longo da costa do Oregon, Estados Unidos. No Panamá, Higgins et al. (2014) estudaram a comunidade de fungos em 11 espécies de gramíneas tropicais.

Estudos de fungos endofíticos associados com gramíneas de regiões semiáridas foram realizados nos Estados Unidos por Porras-Alfaro et al. (2008) que observaram uma alta diversidade de fungos associados à raízes de *Bouteloua gracilis*. Na Venezuela, Loro et al. (2012) avaliaram a diversidade desses organismos em 13 gramíneas obtendo 198 isolados. Em outros estudos realizados em regiões semiáridas dos Estados Unidos, a comunidade desses organismos associada a raízes de *Bouteloua gracilis* e *Sporobolus cryptanthus* foi investigada por Khidir et al. (2010) e os três isolados mais comumente obtidos a partir das raízes de ambas as gramíneas são pertencentes às ordens Pleosporales, Agaricales e Hypocreales. Em contrapartida, em estudos realizados por Rosa et al. (2009) em *Deschampsia antarctica* no continente antártico, apenas 26 isolados de fungos

endófitos foram obtidos a partir de 273 fragmentos de folhas, sugerindo que a baixa frequência e diversidade desses fungos pode ser devida às condições extremas dos ecossistemas antárticos.

Panicum virgatum (switchgrass) é uma gramínea de grande importância para a América do Norte, sendo considerada um potencial candidato para produção de biocombustível. Nos Estados Unidos, foram isolados 197 fungos de folhas e pecíolos dessa planta (KLECZEWSKI et al., 2012), além de 555 isolados de brotos e raízes (GHIMIRE et al., 2011). Varvas et al. (2013) reportaram 58 fungos isolados de *Phleum pratense* que é considerada uma importante gramínea para a agricultura da Europa e América do Norte. Além disso, levantamento sobre a comunidade endofítica em espécies de bambu foram realizadas no continente Asiático. No Japão, foram isolados 257 fungos e classificados em 78 morfotipos sendo a ordem Xylariales a mais representativa (MORAKOTKARN et al., 2007). Estudo na China têm mostrado que fungos endofíticos associados à sementes de bambus apresentam atividades antimicrobianas e podem ser explorados como uma potencial fonte de compostos bioativos (SHEN et al., 2014). A composição de espécies de fungos endofíticos em diferentes espécies de bambu na faixa de habitat do panda gigante foram avaliadas com o intuito de registrar a preferência alimentar dos pandas. Os pandas preferiram espécies de bambu que ocorrem naturalmente em altitudes mais elevadas onde a quantidade total de endófitos tende a ser menor (HELANDER et al., 2013).

Em revisão sobre fungos endofíticos em gramíneas, Marquez et al. (2012) reportaram estudos com diversas espécies de Poaceae: *Ammophila arenaria* (MÁRQUEZ et al., 2008), *Bamboo* spp. (MORAKOTKARN et al., 2007), *Botriochloa macra* (WHITE; BACKHOUSE, 2007), *Bouteloua gracilis* (PORRAS-ALFARO et al., 2008), *Dactylis glomerata* (SÁNCHEZ-MÁRQUEZ et al., 2007), *Deschampsia antarctica* (ROSA et al., 2009), *Festuca arizonica* (SCHULTESS; FAETH, 1998), *Holcus lanatus* (SÁNCHEZ-MÁRQUEZ et al., 2010), *Hypharrhenia hirta* (WHITE; BACKHOUSE, 2007), *Oryza* (FISHER; PETRINI, 1992), *Phragmites australis* (PELÁEZ et al., 1998; WIRSEL et al., 2001), *Stipa grandis* (SU et al., 2010), *Stipa tenacissima* (PELÁEZ et al., 1998), *Triticum aestivum* (SIEBER et al., 1988) e *Zea* sp. (FISHER et al., 1992). Além disso, outras gramíneas também foram estudadas como: *Leymus chinensis* (ZHU et al., 2013), *Hordeum murinum* (MURPHY et al., 2015), *Phragmites australis* (CLAY et al., 2016), *Festuca arundinacea* (SPYREAS et al., 2001), *Festuca paniculata* (MOUHAMADOU et al., 2011), *Phleum pratense* (VARVAS et al., 2012), e *Brachiaria* spp. (GAMA, 2014; RODRIGUEZ et al., 1996).

2.1.3 Diversidade de fungos endofíticos utilizando métodos moleculares

Tradicionalmente, os fungos endófitos podem ser reconhecidos através de duas técnicas básicas: 1) observação direta e 2) métodos dependentes de cultivo (DECKERT et al., 2001; LUCERO et al., 2011). A técnica de isolamento é um processo dependente do método de isolamento de fungos em cultura e é eficaz para a recuperação rápida de um grande número de espécies de fungos endofíticos cultiváveis a partir de tecidos de plantas. No entanto, os fungos são diretamente afetados pelo processo de desinfestação e condições de incubação (SUN et al., 2012).

O isolamento dos fungos endofíticos é importante para realização de estudos detalhados de caracterização dos fungos, dinâmica populacional, diversidade de espécies, bem como para a descoberta de novos agentes para aplicação no melhoramento e no crescimento de plantas e na produção de novos metabólitos (DING et al., 2009; WANG et al., 2010; LI et al., 2011; TEJESVI et al., 2011). No entanto, o desenvolvimento da biologia molecular traz uma nova perspectiva para estudos da diversidade fúngica. A aplicação de técnicas, como DNA “fingerprinting” e métodos de sequenciamento tem o potencial para ultrapassar os obstáculos dos métodos tradicionais que são normalmente dependentes de meios de cultura (SUN et al., 2012).

A maioria dos estudos que visam o conhecimento da diversidade de fungos endofíticos foi realizada através de isolamento a partir de fragmentos de tecidos e posterior sequenciamento de regiões do DNA dos fungos para identificação dos endófitos (HIGGINS et al., 2014; HUANG et al., 2008; THOMAS et al., 2008; U'REN et al., 2012; VEGA et al., 2010). Devido às limitações das técnicas de isolamento tradicionais, é possível que alguns, ou mesmo muitos fungos endofíticos, não sejam isolados. Isso ocorre porque alguns endófitos não se desenvolvem em meio de cultura.

Alguns organismos são biotróficos e não se desenvolvem em meios artificiais, como é o caso dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Técnicas moleculares que permitem a identificação dos FMA dentro das raízes foram desenvolvidas durante a última década (REDECKER, 2002) e dessa forma a diversidade desses organismos pode ser estimada com sucesso a partir de raízes colonizadas permitindo, em muitos casos, a resolução em nível específico (AL-YAHYA'EI et al., 2011; APPOLONI et al., 2008; CESARO et al., 2008; HUSBAND et al., 2002; VALINO et al., 2006).

Os estudos moleculares geralmente envolvem a extração do DNA total genômico (incluindo fungos e plantas) a partir dos tecidos vegetais, amplificação de fragmentos de

DNA e clonagem de produtos de PCR diretamente em plasmídeos (vetor pGEM-T). O sequenciamento dos clones permite identificar os fungos colonizando o vegetal em diversos níveis taxonômicos com base na análise filogenética e comparação entre sequências semelhantes (SUN et al., 2012). Cada sequência é classificada em uma unidade taxonômica operacional (OTU), a qual é uma definição operacional utilizada para classificar grupos de indivíduos intimamente relacionados. Esta unidade é geralmente utilizada quando são conhecidos apenas os dados de sequência de DNA (BLAXTER et al., 2005).

A partir da utilização de técnicas moleculares tornou-se possível identificar endófitos diretamente, a partir de amostras de plantas, sem a necessidade de crescimento em cultura (ZIMMERMAN; VITOUSEK, 2012). Tais técnicas têm permitido a identificação de espécies de fungos de diversos grupos: Ascomycotca, Basidiomycota, Glomeromycota, Mucoromycotina e Chytridiomycota (JIN et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Além disso, OTUs recuperadas a partir de análises de sequências de clones têm indicado que táxons que são de crescimento lento ou, possivelmente, não cultiváveis podem não ter sido detectados em estudos anteriores (JIN et al., 2015).

Alguns estudos têm utilizado ao mesmo tempo métodos dependentes de cultura e métodos independentes de cultura (PCR direta). Higgins et al. (2011) observaram que a diversidade de endófitos em folhas de gramíneas tropicais foi maior com a utilização de técnicas de PCR direta do que a partir de técnicas de cultivo, reportando representantes de duas classes (Pezizomycetes e Leotiomycetes) que não foram isolados em cultura. Em investigação com endófitos de raízes de arroz, foi observado que 60,2% dos clones tinham sequências que estavam próximas, embora não fossem idênticas aos táxons que são atualmente conhecidos (YUAN et al., 2010). Comparando a diversidade de fungos endófitos em folhas de mudas e de indivíduos adultos de pinheiros (*Pinus taeda*), Oono et al. (2015) observaram a formação de várias OTUs que estavam relacionadas com a presença de fungos comumente cultivados, além de outras relacionadas a fungos que não haviam sido encontrados a partir de cultivo em meio.

Nos últimos anos, cada vez mais trabalhos têm sido realizados com o uso apenas de técnicas moleculares independentes, sem que os fungos endofíticos sejam cultivados, principalmente em hospedeiros vegetais de importância econômica. Pan et al. (2008) sequenciaram quase 3000 clones obtidos a partir de 58 plantas, com o objetivo de caracterizar a comunidade de endófitos em milho. Bokati et al. (2016) caracterizaram a comunidade de fungos endófitos associados a raízes de milho e trigo. Os endófitos de

trigo duro (VUJANOVIC et al., 2012) e trigo comum (LIKAR et al., 2008) também foram investigados. Outros estudos têm sido realizados com arroz (YUAN et al., 2010), “switchgrass” (*Panicum virgatum*) (KLECZEWSKI et al., 2012) e raízes de batata (*Solanum tuberosum*) (GOTZ et al., 2006).

Em regiões semiáridas, estudos sobre a diversidade de fungos endofíticos foram realizados em folhas e raízes de 13 espécies de gramíneas (LORO et al., 2012) e em raízes de *Bouteloua gracilis* e *Sporobolus cryptandrus* em pastagens (KHIDIR et al., 2010). Técnicas moleculares também foram utilizadas para estudos da diversidade de endófitos em raízes de *Bouteloua gracilis* no Novo México (HERRERA et al., 2010), *Phragmites australis* (CLAY et al., 2016) e arroz selvagem (*Oryza granulate*) (YUAN et al., 2010); e também em folhas de carvalho (*Quercus gambelii*) (SZINK et al., 2016), pinheiro (*Pinus taeda*) (ARNOLD et al., 2007), *Metrosideros polymorpha* (ZIMMERMAN et al., 2011) e *Bouteloua gracilis*, (PORRAS-ALFARO et al., 2008).

Atualmente, técnicas de sequenciamento são utilizadas com muita frequência no estudo da diversidade de fungos endofíticos. Além do sequenciamento de primeira geração (baseado no método de Sanger), sequenciadores de segunda geração (pirosequenciamento) e terceira geração (íonsequenciamento) também são utilizados para o estudo do microbioma permitindo o sequenciamento massivo de DNA fúngico a partir de amostras vegetais. ZHANG & YAO (2015) avaliaram a diversidade e distribuição das comunidades de fungos endofíticos associados a folhas e caules de quatro espécies de plantas em regiões árticas usando sequenciamento baseado na plataforma 454. No estudo citado acima foram obtidas 76.691 sequências de DNA de fungos endofíticos distribuídos nos seguintes grupos: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota e outros fungos até então desconhecidos. Por outro lado, em regiões semiáridas, foram estudados o microbioma de Cactaceae com o uso da tecnologia Illumina (GARCIA et al., 2016). Sequenciadores de terceira geração (íonsequenciamento) foram utilizados para avaliar a comunidade de endófitos em *Eucalyptus grandis* (KEMLER et al., 2013).

2.2 O SORGO (*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH)

2.2.1 Classificação, Origem e Importância do Sorgo

Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é um cereal membro da família Poaceae (ADEYEYE; ADESINA, 2013). Inicialmente o sorgo foi descrito por Linnaeus em 1753 sob o nome de *Holcus*. No entanto em 1974, Moench separou o sorgo do gênero *Holcus* e

propôs a combinação *Sorghum bicolor*. Além disso, Moench aumentou a lista de sinônimos de *Sorghum bicolor* (CLAYTON, 1961; HOUSE, 1978), ou seja, sinonimizando nomes dados por vários taxonomistas a plantas idênticas a *S. bicolor* (L.) Moench (MEKBIB, 2007).

A origem exata do sorgo não foi totalmente esclarecida, o que se sabe é que pode ser originário do continente africano. Alguns autores sugerem que tenha se originado no quadrante noroeste da África, abaixo do deserto do Sahara, provavelmente nas regiões da Etiópia e Sudão (SANTOS et al., 2005). Segundo registros arqueológicos, a domesticação do sorgo deve ter acontecido por volta de 3000 a.C. mas ainda não se sabe quando e como o sorgo se dispersou para fora da África. Não sendo nativo do hemisfério ocidental, o sorgo foi introduzido bem mais recentemente nas Américas (EMBRAPA, 2007).

O sorgo é a principal fonte de energia para milhões de pessoas (ADEYEYE; ADESINA, 2013; SHER et al., 2013), sendo o quinto cereal mais produzido no mundo, atrás apenas do trigo, arroz, milho e cevada (CONAB, 2015; SHER et al., 2013). Os maiores produtores mundiais são os Estados Unidos, seguidos do México, que produziu cerca de 6,2 milhões de toneladas na safra 2014/15. O 3º maior produtor mundial do grão é a Nigéria, que vem apresentando queda na produção dos últimos anos. A Índia já foi o maior produtor mundial desse grão, atualmente ocupa o 4º lugar na produção mundial. O Brasil ocupa a 10ª posição na produção mundial de sorgo com uma produção de 1.941,4 mil toneladas (CONAB 2015).

No Brasil o sorgo é basicamente consumido internamente. As regiões Centro-Oeste e Sudeste respondem por mais de 80% da produção nacional de sorgo. O estado de Goiás lidera a produção com 851,1 mil toneladas, seguido por Minas Gerais (497,5 mil toneladas) e Mato Grosso (206,7 mil toneladas). A produção da região Nordeste é de 135,7 mil toneladas sendo a Bahia o maior produtor, com 115 mil toneladas, seguida do Piauí (15,8 mil toneladas) e Pernambuco (2,7 mil toneladas) (CONAB, 2015).

O sorgo é uma cultura de ciclo curto (90 a 130 dias), podendo ser plantado no período de entressafra da cana-de-açúcar (SOUZA et al., 2005). Quanto ao seu valor nutritivo, o sorgo pode ser comparado ao milho (*Zea mays*). No entanto, o sorgo destaca-se por sua maior tolerância à seca, sua capacidade de recuperação e produção após períodos de déficit hídrico, respondendo até em solos com limitações de nutrientes (RODRIGUES et al., 2002; VIEIRA et al., 2004). Além disso pode crescer em ambientes áridos e semi-áridos adaptando-se facilmente a situações de déficit hídrico em condições de baixa

fertilidade dos solos, onde a produção de milho pode exigir o dobro de água (RIBAS, 2010; TROUCHE et al., 2008).

Para o Nordeste do Brasil, o sorgo surge como uma cultura alternativa, pois as condições de solo e escassez de água são fatores limitantes para a produção da maioria das gramíneas (MENDES, 1986), onde, culturas como o milho, não atingem a produtividade máxima de grãos ou de forragem (MOLINA et al., 2000). Convém salientar que o cultivo de plantas com essas características no semiárido de Pernambuco constitui uma meta fundamental para a ascensão agrícola dessa região (SANTOS et al., 1994).

Agronomicamente, as variedades de sorgos são classificadas em quatro grupos: granífero, forrageiro, sacarino e vassoura (EMBRAPA, 2009). No Brasil, o sorgo granífero é o que tem maior expressão econômica (EMBRAPA, 2009), o qual apresenta porte baixo, entre 0,8 e 1,2 m de altura, produzindo na extremidade superior, uma panícula (cacho) compacta de grãos. Nesse tipo de sorgo o produto principal é o grão (SILVA et al., 2010) e pode substituir o milho na época da safrinha, visando à produção de matéria-prima para a fabricação de ração animal, principalmente, quando ocorre escassez do milho no mercado, elevando os custos da alimentação animal (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Popescu & Condei (2014) destacam algumas vantagens da cultura do sorgo, tais como: composição química semelhante à do milho; substitui parcialmente o milho nas receitas para alimentação animal; apresenta um sistema de raiz bem desenvolvido; é uma cultura altamente resistente à seca; não exige solos férteis; requer menos fertilizantes que o milho ou outras culturas; requer menos água para crescer do que o milho; é altamente resistente a pragas e doenças; pode ser cultivado em todos os continentes; é uma cultura de baixo custo de produção em relação ao milho; possui alto potencial de produção além de ser matéria-prima para a produção de bioetanol.

2.2.2 Fenologia da planta

A fenologia estuda a ocorrência de eventos biológicos periódicos relacionados com fatores bióticos e abióticos e a interrelação desses eventos com a mesma espécie ou espécies diferentes (LIETH, 1974).

O sorgo é uma planta C4, de dia curto e com altas taxas fotossintéticas. A maioria das variedades desta planta requer temperaturas superiores a 21 °C para um bom crescimento e desenvolvimento (MAGALHÃES; DURÃES, 2003). O ciclo do sorgo apresenta três estágios, caracterizados pelas etapas de crescimento da cultura, baseados nos dias após a semeadura. O primeiro estágio (EC1) caracteriza-se pelo crescimento da

cultura que vai da germinação até a iniciação da panícula, sendo o período mais importante para o estabelecimento das plântulas. O segundo estágio (EC2) compreende da iniciação da panícula até o florescimento. Nesta fase ocorrem vários processos de crescimento, tais como, desenvolvimento da área foliar, sistema radicular, acumulação de matéria seca e o estabelecimento de um número potencial de sementes. Se a planta for afetada neste período, o rendimento poderá ser comprometido. O terceiro estágio (EC3) compreende desde floração até a maturação fisiológica. Os fatores mais importantes neste estágio são aqueles relacionados ao enchimento de grãos (MAGALHÃES; DURÃES, 2003).

As fases de crescimento e desenvolvimento da maioria das culturas são particularmente definidas, porém pode existir variação nesses períodos, em função do local, época de semeadura e das condições climáticas às quais a planta é exposta (COSTA, 2013).

2.2.3 Período reprodutivo do sorgo

O período reprodutivo é dividido em três subperíodos: florescimento-polinização, polinização-maturação fisiológica e maturação fisiológica-colheita. Na cultura de sorgo, o florescimento começa no ápice da panícula e continua em direção à base. É uma espécie autógama, com baixa taxa de fecundação cruzada. O período situado entre duas a três semanas antes e duas a três semanas após o florescimento é considerado o período de maior exigência hídrica. Por ocasião do florescimento, as plantas de sorgo atingem seu índice de área foliar máximo (RODRIGUES; SILVA, 2011).

A duração do subperíodo polinização-maturação fisiológica é de aproximadamente 35 dias. Logo após a formação, os grãos passam pelos estádios de grãos aquosos, grãos leitosos, grãos em massa mole e grãos em massa dura, até atingirem a maturação fisiológica. O subperíodo maturação fisiológica-maturação de colheita depende basicamente das condições meteorológicas vigentes durante este intervalo de tempo, passando os grãos por um processo físico de perda de umidade. Após a maturação fisiológica, a planta pode levar de sete a 20 dias até atingir condições para ser colhida de forma mecanizada (RODRIGUES; SILVA, 2011).

2.2.4 Variedades de Sorgo

O sorgo granífero pode ser utilizado na indústria de produtos como amido, cera, cerveja e óleo (OLIVETTI; CAMARGO, 1997; RIBAS, 2007) e na alimentação humana (farinha) por constituir uma fonte de valor nutritivo alto em proteínas, vitaminas e minerais

(NEUMANN; RESTLE; BRONDANI, 2004). No Brasil, vem sendo cultivado principalmente visando a produção de grãos para suprir a demanda das indústrias de ração animal ou como forragem, para alimentação de ruminantes (QUEIROZ et al., 2014).

Mais de 35 % da produção de sorgo é destinado ao consumo humano e o restante é usado, principalmente, na alimentação animal (AWIKA; ROONEY, 2004). Porém, no Brasil, praticamente não há consumo de sorgo na alimentação humana. É possível confeccionar produtos alimentícios de qualidade, a partir de cultivares de sorgo selecionadas com características tecnológicas adequadas (ROONEY, 2001). Uma forte vantagem do sorgo na alimentação humana é o fato de não haver glúten no mesmo, sendo uma alternativa viável na substituição do trigo (QUEIROZ et al., 2014).

A variedade sorgo sacarino possui grande valor para alimentação animal, e seu bagaço é utilizado principalmente no setor sucroalcooleiro. É cultivado principalmente no verão, visando fornecer matéria prima de qualidade para abastecer o mercado na entressafra da cana-de-açúcar, de forma a reduzir a instabilidade do mercado de etanol no Brasil (EMBRAPA, 2013; SANTOS et al., 1986). O sorgo sacarino caracteriza-se por apresentar colmos rico em açúcares fermentescíveis e servir para a produção de etanol. Trata-se de uma variedade de sorgo de ciclo rápido, de cultivo totalmente mecanizável, com alta produtividade de biomassa verde e com alto rendimento de etanol, cujo bagaço pode ser utilizado na geração de energia. Talvez sua maior vantagem seja a resistência ao estresse hídrico, adaptando-se bem à escassez de chuvas da região semiárida (DURÃES, 2011).

O sorgo forrageiro pode ser o resultado da hibridização entre *Sorghum bicolor* e *Sorghum sudanense*. Sua biomassa é apropriada para confecção de silagem, pastejo, corte verde, fenação e cobertura morta. Na produção de silagem, é indicado por apresentar elevado rendimento e características que favorecem o perfil de fermentação (FERNANDES et al., 2009). O sorgo vassoura possui panículas com fibras longas e são utilizadas quase que exclusivamente para produção de vassouras e escovas (OLIVETTI; CAMARGO, 1997; RIBAS, 2007).

2.2.5 Linhagem IPA SF15

A variedade de sorgo forrageiro IPA SF15, foi originada a partir do cruzamento entre as variedades sacarina IPA 7301218 e IPA 7301158, a linhagem IPA SF15 foi testada e avaliada em diferentes ambientes da região semiárida dos estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Alagoas, sendo obtidos altos valores de rendimento

de matéria seca e adaptabilidade (TABOSA et al., 2002). O desenvolvimento de novos cultivares promissores torna-se necessário para cultivo em regiões como o nordeste brasileiro, principalmente em regiões com períodos prolongados de seca (MONTEIRO et al., 2004; TABOSA et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE COLETA

3.1.1 Estação Experimental de Itapirema (Goiana)

A Estação Experimental de Itapirema, pertence ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), está localizada no município de Goiana, na mesorregião da Zona da Mata de Pernambuco (07°38'33" S e 34°56'50"O), domínio do bioma Mata Atlântica. O clima da região é caracterizado como tropical chuvoso (Am) de acordo com Köppen, com predominância de solo de baixa fertilidade natural do tipo argissolo vermelho amarelo plúntico e latossólico (Pod-zólico) – latosol vermelho amarelo Distrófico.

3.1.2 Estação Experimental de Serra Talhada

A Estação Experimental de Serra Talhada, pertence ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), está localizada no município de Serra Talhada, Microrregião do Sertão do Pajeú (semiárido), Mesorregião do Sertão Pernambucano (07°59'00S, 38°19'16W), domínio do bioma floresta tropical seca (Caatinga). O clima da região é caracterizado como semiárido (BSwh') de acordo com Köppen, com predominância de solo do tipo Argissolo vermelho amarelo equivalente Eutrófico – Neossolos litólicos Eutróficos e Luvisolo (Bruno não cálcico).

3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

No período de julho/2014 a dezembro/2015, foram realizadas quatro coletas de raízes de sorgo (variedade IPA SF15) nas áreas escolhidas para o estudo, sendo duas no período de pré-floração e duas no período de pós-floração da planta hospedeira (Figura 1 e 2).

Amostras de raízes foram coletadas em quatro parcelas delimitadas em cada área de estudo. Em cada parcela foram retiradas, cuidadosamente, três amostras de raízes em três pontos aleatórios, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente

etiquetados. Dessa forma, foram coletadas 12 amostras por área $\times$ dois períodos (pré e pós-floração) $\times$ duas coletas $\times$ duas áreas de coleta, o que totalizou 96 amostras. Com relação à análise molecular das raízes, cada área de estudo teve quatro amostras compostas no total, pois parte das três amostras de raízes coletadas em cada parcela foram reunidas, formando uma única amostra que serviu para a extração do DNA total das raízes e fungos presentes nas mesmas.

O material coletado foi transportado ao Laboratório I da Pós-Graduação em Biologia de Fungos, para manipulação e processamento do mesmo no tempo máximo de 24h.

Figura 1 – Cultivo de *Sorghum bicolor* no período de pré (A) e pós-floração (B) em Goiana, Pernambuco.



Fonte: (Rejane Silva, 2015)

Figura 2: Cultivo de *Sorghum bicolor* no período de pré (A) e pós-floração (B) em Serra Talhada, Pernambuco.



Fonte: (Rejane Silva, 2015)

3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Raízes foram lavadas com água corrente e detergente neutro, fragmentadas em 5 mm de comprimento, desinfestadas em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio

(NaOCl) a 3% de cloro ativo (3-4 minutos), novamente em álcool 70% (30 segundos) e em seguida lavadas com água destilada esterilizada (modificado de ARAÚJO et al., 2001). Após assepsia, seis fragmentos foram transferidos para placas de Petri, em triplicata, contendo Extrato de Malte (MEA) acrescido de cloranfenicol (50mg/L^{-1}), incubados em temperatura ambiente ($28\pm 2^\circ\text{C}$) e observados diariamente por até 15 dias quanto ao desenvolvimento das colônias fúngicas ao redor do fragmento da raiz. Para o controle da assepsia, $50\mu\text{L}$ da última água utilizada na lavagem das raízes, foi plaqueada em MEA como comprovação da desinfestação superficial (PEREIRA, 1993). Após crescimento das colônias, fragmentos de micélio foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA para posterior identificação das espécies.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA DOS FUNGOS

A biomassa dos fungos foi obtida a partir de culturas em meio MEA contido em tubos de ensaio, mantidos a 28°C por até seis dias. Todo micélio foi retirado do tubo de ensaio com o auxílio de uma alça de platina, sendo o material transferido para microtubos de 2 ml com tampa de rosca, acrescidos de 0,5g de contas de vidro (glass beads) com dois diâmetros diferentes na proporção de 1:1 (acid-washed, $150\text{-}212\mu\text{m}$ and $425\text{-}600\mu\text{m}$; Sigma, U.S. sieve). O material foi triturado por agitação em alta velocidade em um homogeneizador do tipo FastPrep.

A extração do DNA genômico foi realizada, com o material previamente triturado, conforme Góes-Neto et al. (2005), que inclui homogeneização do material em tampão CTAB 2% e uma lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em $50\mu\text{L}$ de água ultrapura.

3.5 EXTRAÇÃO DO DNA DAS RAÍZES

A extração do DNA total das raízes do sorgo foi realizada utilizando o DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Crawley, UK), de acordo com as instruções do fabricante para amostras congeladas.

3.6 AMPLIFICAÇÃO

Para amplificação do ITS rDNA foram utilizados os primers ITS1/ITS1F para amplificação do DNA genômico extraído das raízes (GARDES; BRUNS 1993/WHITE et al. 1990) e ITS1/ITS4 (WHITE et al. 1990) para os fungos isolados em cultura. Os parâmetros de ciclagem para as duas PCRs foram: 95°C 4 min (1 ciclo), 94°C 45s, 56°C

1 min, 72 °C 1 min (35 ciclos), 72°C 7 min (1 ciclo). As concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram as mesmas descritas por Kaliyaperumal & Kalaichelvan (2008). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações. Os produtos das reações de PCR (5 µL) foram visualizados sob luz UV a partir de eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed.

3.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR foram purificados usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA); a clonagem foi realizada com o pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA) de acordo com recomendações do fabricante. Posteriormente, os plasmídeos foram purificados e sequenciados com os *primers* recomendados pelo fabricante do kit de clonagem.

3.8 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A filogenia foi reconstruída por meio de análises independentes de sequências da região ITS. As seqüências obtidas foram alinhadas com outras recuperadas do GenBank (de acordo com o grupo de fungos em questão) com o auxílio do programa MEGA version 5.05 (TAMURA et al., 2007).

A caracterização molecular final se deu com a avaliação filogenética e construção de árvores. As análises de neighbor joining (1.000 repetições de bootstraps cada) foram obtidas com o programa MEGA version 5.05 (TAMURA et al., 2007). As análises bayesiana (1×10^6 gerações) e de máxima verossimilhança (1.000 bootstraps) foram realizadas, respectivamente, com MrBayes 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK 2003) e PhyML (GUINDON; GASCUEL 2003), executados a partir do programa Topali 2.5 (MILNE et al. 2004). O modelo de substituição nucleotídica (SYM+G) foi estimado usando Topali 2.5.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises dos dados moleculares e morfológicos foram realizadas individualmente, e comparações entre os dois métodos de identificação de espécies também foram computadas de acordo com os seguintes métodos: A diversidade alfa foi estimada pela rarefação e extrapolação (R/E) das OTUs recuperadas pelo método independente de cultivo e das espécies recuperadas pelo método dependente de cultivo,

contabilizando-se a intensidade da amostragem (COLWELL et al. 2012), utilizando funções do pacote do R 'iNEXT' (HSIEH et al. 2016). Para evitar influência da intensidade amostral e possíveis erros em padrões de diversidade, os dados morfológicos e moleculares foram padronizados para o número de amostras. Para testar a variação na diversidade alfa entre os períodos de floração e entre os locais amostrados o modelo linear generalizado (GLM) foi aplicado, usando floração e local como fatores fixos. As médias resultantes do modelo linear foram estatisticamente comparadas através da comparação múltipla com o *post-hoc* teste de Tukey, nível de confiança $P < 0.05$, implementando-se funções do pacote do R 'agricolae' (de Mendiburu, 2017). Posteriormente a diversidade alfa entre os dados morfológicos e moleculares foi comparadas, seguindo-se os métodos mencionados acima, e dessa vez, o tipo de identificação de espécie foi colocado no modelo linear como fator fixo.

As comunidades de fungos endofíticos foram comparadas por análise multivariada usando o pacote 'vegan' do R (OKSANEN et al., 2015). Os dados da comunidade endofítica foram padronizados de acordo com o método de "hellinger", para evitar a intensidade variável da amostragem devido à diferença no número de espécies, utilizando a função "decostand" do pacote 'vegan'. Os padrões de distribuição da comunidade de fungos endofíticos foram analisados de acordo com a análise de redundância baseado na distância (db-RDA), utilizando-se Bray-Curtis para produzir a matriz de dissimilaridades entre as amostras. As comparações da estrutura da comunidade de fungos endofíticos entre os dois métodos de identificação também foram analisadas de acordo com os métodos mencionados acima.

4 RESULTADOS

4.1 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM RAÍZES DE *SORHUM BICOLOR*

Dos fragmentos de raízes analisados foram recuperados 558 clones viáveis e 797 isolados de fungos endofíticos, os quais foram distribuídos em 101 morfotipos/OTUs. De forma geral, quando observada a frequência relativa dos dados compilados dos morfotipos isolados, *Fusarium* foi o gênero mais frequente. A espécie *F. acutatum* (OTU 04/R667) apresentou frequência relativa de 19,26 % seguida por *F. solani* (OTU 21/R992) com 9,08 %. Espécies de outros gêneros também apresentaram altos valores de frequência relativa; *Aspergillus niger* (R354) com 4,72 % e *Amesia nigricolor* (R175) 3,91 %, porém a grande

maioria dos morfotipos/OTUs apresentou frequência de ocorrência abaixo de 1 % (Tabela 1).

Tabela 1 – Identificação molecular, frequência absoluta (fa) e relativa (fr) das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo método dependente de cultura (isolado) e pelo método independente de cultura (OTU), frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos isolados de raízes de *Sorghum bicolor* em Pernambuco.

Fungo endofítico	Melhor Blast Hit					Método	fa	fr (%)
	Fungo endofítico	Ordem	Classe	No. Acesso	Similaridade (%)			
OTU 01	Uncultured Agaricales clone HEP1c201	Agaricales	Agaricomycetes	JN802293	99	IC	93	6,86
OTU 02	<i>Hortaea werneckii</i>	Dothideales	Dothideomycetes	NR_145338	99	IC	1	0,07
OTU 03	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Cantharellales	Agaricomycetes	DQ102436	99	IC	12	0,89
OTU 04/R667	<i>Fusarium acutatum</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	NR_111142	99	IC/DC	261	19,26
OTU 05/R50	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	KP942940	99	IC/DC	39	2,88
OTU 06	<i>Talaromyces thailandensis</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_147428	98	IC	14	1,03
OTU 07/R286	<i>Gelasinospora tetrasperma</i>	Sordariales	Sordariomycetes	NR_077163	99	IC/DC	36	2,66
OTU 08/R58	<i>Fusarium</i> sp.	Hypocreales	Sordariomycetes	FJ904916	99	IC/DC	7	0,52
OTU 09	<i>Clydaea vesicula</i>	Lobulomycetales	Chytridiomycetes	NR_121339	93	IC	4	0,30
OTU 10	Uncultured <i>Epicoccum</i>	Pleosporales	Dothideomycetes	HG937120	91	IC	2	0,15
OTU 11/R599	<i>Periconia macrospinoso</i>	Microascales	Sordariomycetes	KP183999	99	IC/DC	71	5,24
OTU 12	<i>Phaeosphaeriopsis musae</i>	Pleosporales	Dothideomycetes	DQ885894	99	IC	2	0,15
OTU 13	<i>Acrophialophora fusispora</i>	incertae sedis	incertae sedis	KP233037	94	IC	1	0,07
OTU 14	<i>Myceliophthora verrucosa</i>	Sordariales	Sordariomycetes	KR014346	100	IC	2	0,15
OTU 15	Fungal sp.	incertae sedis	incertae sedis	KU977894	97	IC	1	0,07
OTU 16	Uncultured root-associated fungus	incertae sedis	Agaricomycetes	FJ362105	92	IC	1	0,07
OTU 17/R102	Uncultured <i>Humicola</i>	incertae sedis	incertae sedis	KP235550	99	IC/DC	4	0,30
OTU 18/R82	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-A isolate Rh228	Cantharellales	Agaricomycetes	KC782943	99	IC/DC	6	0,44
OTU 19/R174	Uncultured Sordariales clone HEP2c241	Sordariales	Sordariomycetes	JN802301	98	IC/DC	32	2,36
OTU 20	Uncultured soil fungus	Pleosporales	Dothideomycetes	DQ420933	99	IC	1	0,07
OTU 21/R992	<i>Fusarium solani</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	KU872821	99	IC/DC	123	9,08
OTU 22	Uncultured <i>Ceratobasidium</i> clone T18DA2	Cantharellales	Agaricomycetes	EF154354	98	IC	6	0,44

OTU 23	Uncultured soil fungus clone 151b32	Pleosporales	Dothideomycetes	DQ420831	98	IC	3	0,22
OTU 24	<i>Corynascella humicola</i>	Sordariales	Sordariomycetes	NR_147672	99	IC	4	0,30
OTU 25	Uncultured Sordariales clone 8WF1cf09	Sordariales	Sordariomycetes	GU910736	96	IC	2	0,15
OTU 26	<i>Latorua caligans</i>	Pleosporales	Dothideomycetes	NR_132923	95	IC	1	0,07
OTU 27	<i>Metschnikowia saccharicola</i>	Saccharomycetales	Saccharomycetes	AB697757	98	IC	2	0,15
OTU 28/R100	Uncultured <i>Phoma</i>	Pleosporales	Dothideomycetes	KF493958	97	IC/DC	8	0,59
OTU 29	Uncultured endophytic	Sordariales	Sordariomycetes	FJ524302	96	IC	12	0,89
OTU 30	Uncultured Ascomycota	incertae sedis	incertae sedis	HM161973	95	IC	4	0,30
OTU 31	Uncultured Ascomycota clone 20	incertae sedis	incertae sedis	KF060232	90	IC	1	0,07
OTU 32	<i>Zopfiella</i> sp.	Sordariales	Sordariomycetes	HQ631038	95	IC	2	0,15
OTU 33	Uncultured <i>Cryptococcus</i>	Tremellales	Tremellomycetes	JQ951590	99	IC	1	0,07
OTU 34	Uncultured fungus	incertae sedis	incertae sedis	AJ875391	99	IC	34	2,51
OTU 35	<i>Pleosporales</i> sp.	Pleosporales	Dothideomycetes	KY987537	99	IC	10	0,74
OTU 36	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	Dothideomycetes	KF512828	100	IC	1	0,07
OTU 37	<i>Marasmius brunneoaurantiacus</i>	Agaricales	Agaricomycetes	KX149014	99	IC	5	0,37
OTU 38	Uncultured Ascomycota clone MO1	Pleosporales	Dothideomycetes	EU490176	99	IC	1	0,07
OTU 39	Uncultured fungus	incertae sedis	incertae sedis	JX369949	99	IC	1	0,07
OTU 40	<i>Dentiscutata heterogama</i>	Diversisporales	Glomeromycetes	FR750016	91	IC	1	0,07
OTU 41	<i>Rhizoglosum aggregatum</i>	Glomerales	Glomeromycetes	JF439132	98	IC	1	0,07
OTU 42	Uncultured soil	incertae sedis	incertae sedis	DQ420987	97	IC	1	0,07
OTU 43/R30	<i>Chaetomium megalocarpum</i>	Sordariales	Sordariomycetes	NR_144832	99	IC/DC	14	1,03
OTU 44	Uncultured Pleosporales	Pleosporales	Dothideomycetes	JN802304	99	IC	1	0,07
OTU 45	Uncultured fungus	incertae sedis	incertae sedis	JX385508	95	IC	2	0,15
OTU 46	Uncultured fungus clone FA3-O19	incertae sedis	incertae sedis	JX984791	92	IC	1	0,07
OTU 47	Uncultured Ceratobasidiaceae clone DOf	Cantharellales	Agaricomycetes	JX545227	99	IC	5	0,37
OTU 48	Uncultured Agaricales	Agaricales	Agaricomycetes	KX499268	99	IC	6	0,44
OTU 49	<i>Exophiala spinifera</i>	Chaetothyriales	Eurotiomycetes	KC445294	99	IC	18	1,33
OTU 50	Uncultured Ascomycota clone 1029	Hypocreales	Sordariomycetes	HM161926	99	IC	21	1,55

OTU 51/R256	<i>Fusarium verticillioides</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	AB587011	99	IC/DC	5	0,37
OTU 52	Uncultured Entoloma	Agaricales	Agaricomycetes	JX135066	91	IC	15	1,11
OTU 53	Uncultured basidiomycete	incertae sedis	incertae sedis	AM901708	99	IC	1	0,07
OTU 54	<i>Podospora dimorpha</i>	Sordariales	Sordariomycetes	NR_119564	97	IC	4	0,30
OTU 55/R1052	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Botryosphaeriales	Dothideomycetes	KF951631	99	IC/DC	13	0,96
OTU 56/R641	Uncultured Sordariales	Sordariales	Sordariomycetes	JN802314	96	IC/DC	10	0,74
OTU 57/R352	<i>Achroistachys levigata</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	NR_145066	99	IC/DC	39	2,88
OTU 58	Uncultured Zopfiella	Sordariales	Sordariomycetes	KU534794	99	IC	1	0,07
OTU 59	Uncultured fungus	Sordariales	Sordariomycetes	JX984769	99	IC	31	2,29
OTU 60	<i>Fusarium neocosmosporiellum</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	KM231804	99	IC	5	0,37
OTU 61	Uncultured fungus	Hypocreales	Sordariomycetes	JX325680	95	IC	2	0,15
OTU 62	<i>Gibberella thapsina</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	EF152433	100	IC	3	0,22
OTU 63	Uncultured Hypocreales	Hypocreales	Sordariomycetes	HQ389514	93	IC	1	0,07
OTU 64	Uncultured fungus	Sordariales	Sordariomycetes	JX317197	100	IC	1	0,07
OTU 65/R172	<i>Pseudophialophora sorghi</i>	Magnaporthales	Sordariomycetes	KY421938	100	IC/DC	2	0,15
OTU 66	<i>Ascomycota</i> sp.	incertae sedis	incertae sedis	KU535743	81	IC	1	0,07
OTU 67	<i>Coniocessia nodulisporioides</i>	Xylariales	Sordariomycetes	GU553333	99	IC	1	0,07
OTU 68	<i>Rhizoctonia solani</i>	Cantharellales	Agaricomycetes	KX468796	99	IC	1	0,07
R101	<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i>	Xylariales	Sordariomycetes	NR_145240	100	DC	1	0,07
R103	<i>Penicillium reticulisporum</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_121231	99	DC	2	0,15
R1069	<i>Penicillium javanicum</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_111511	99	DC	1	0,07
R1115	<i>Trichoderma harzianum</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	KX379156	100	DC	1	0,07
R113	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_111414	100	DC	1	0,07
R171	<i>Talaromyces assiutensis</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	KM458833	99	DC	2	0,15
R175	<i>Amesia nigricolor</i>	Sordariales	Sordariomycetes	KX976578	99	DC	53	3,91
R219	<i>Mucor indicus</i>	Mucorales		NR_077173	99	DC	8	0,59
R223	<i>Setosphaeria rostrata</i>	Pleosporales	Dothideomycetes	KP340116	100	DC	10	0,74
R261	Uncultured fungus	incertae sedis	incertae sedis	KU931382	99	DC	32	2,36

R306	<i>Penicillium oxalicum</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	KY400098	100	DC	1	0,07
R317	<i>Aspergillus rugulosus</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_131290	100	DC	8	0,59
R321	<i>Aspergillus clavatonanicus</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_135410	100	DC	1	0,07
R335	<i>Talaromyces atroroseus</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_137815	99	DC	4	0,30
R354	<i>Aspergillus niger</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	MF067456	100	DC	64	4,72
R367	<i>Talaromyces</i> sp.	Eurotiales	Eurotiomycetes	KU556510	99	DC	1	0,07
R378	Fungal sp.	Eurotiales	Eurotiomycetes	KT37559	99	DC	20	1,48
R426	<i>Xylaria</i> sp.	Xylariales	Sordariomycetes	JX523620	97	DC	3	0,22
R493	<i>Penicillium menonorum</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_137063	99	DC	1	0,07
R498	<i>Aspergillus terreus</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_131276	98	DC	4	0,30
R504	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	NR_137513	99	DC	4	0,30
R522	<i>Striaticonidium brachysporum</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	KU847230	99	DC	1	0,07
R553	<i>Mucor irregularis</i>	Mucorales		JX976247	99	DC	2	0,15
R60	<i>Curvularia eragrostidis</i>	Pleosporales	Dothideomycetes	KT933674	99	DC	48	3,54
R611	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	Dothideomycetes	KJ188719	99	DC	1	0,07
R657	<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	NR_137298	99	DC	2	0,15
R667	<i>Rhizopus oryzae</i>	Mucorales		KJ744361	99	DC	7	0,52
R680	Uncultured Pleosporales	Pleosporales	Dothideomycetes	JN802318	99	DC	1	0,07
R723	<i>Albifimbria terrestris</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	KU845884	99	DC	1	0,07
R820	<i>Sarocladium</i> sp.	Hypocreales	Sordariomycetes	KU504326	99	DC	1	0,07
R838	<i>Xenomyrothecium tongaense</i>	Hypocreales	Sordariomycetes	KU847246	99	DC	1	0,07
R89	<i>Talaromyces pinophilus</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes	GU595046	99	DC	49	3,62
R929	<i>Neurospora intermedia</i>	Sordariales	Sordariomycetes	KT959290	99	DC	1	0,07
							1355	100

(IC) Independente de cultivo; (DC) Dependente de cultivo

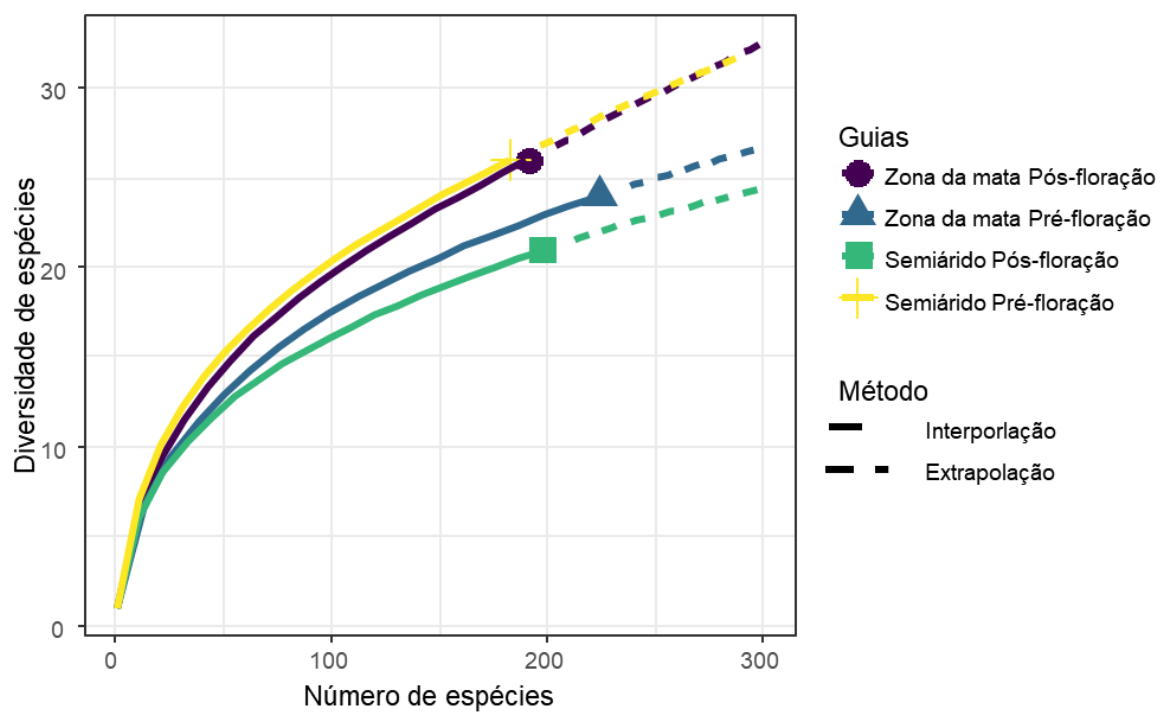
No total 101 filoespécies provenientes dos OTUs e dos morfotipos foram obtidas a partir de fragmentos de raízes de sorgo em dois períodos (pré e pós-floração) e em duas áreas de coleta (Serra Talhada e Goiana). As ordens mais abundantes foram Sordariales e Hypocreales com 18 filoespécies, Pleosporales com 17, Eurotiales com 16, Cantharellales com cinco e Mucorales e Xylariales com três, cada. No entanto, a maioria dos filoespécies ocorreu apenas uma vez, sendo representada pelas seguintes ordens: Lobulomycetales, Diversisporales, Chaetothyriales, Glomerales, Dothideales, Botryosphaeriales, Saccharomycetales, Microascales, Magnaporthales e Tremellales. Embora a maior parte das filoespécies obtidas sejam classificadas nas ordens anteriores, 14 não estão relacionadas a nenhuma ordem, sendo classificadas como *incertae sedis* (Tabela 1).

4.2 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POR MÉTODO DEPENDENTE DE CULTIVO (ISOLAMENTO)

Dos 1728 fragmentos de raízes analisados foram isolados um total de 797 isolados de fungos endofíticos, correspondendo a uma taxa de colonização de 46,12%. Considerando as áreas de coletas separadamente, foram observados 864 fragmentos de raízes da área de Zona da Mata, dos quais 419 foram colonizados por fungos endofíticos, o que corresponde a uma taxa de colonização de 48,49%. Para o semiárido, dos 864 fragmentos de raízes foram isolados fungos de 378, o que corresponde a uma taxa de colonização de 43,74%. Quarenta e cinco táxons de fungos endofíticos foram recuperados a partir dos fragmentos de raízes coletados nas duas áreas. A curva de acumulação de espécies, baseada no número de indivíduos, mostrou que foi possível recuperar a maior diversidade no período de pré-floração no semiárido e menor diversidade foi observada no período de pós-floração também no semiárido (Figura 3).

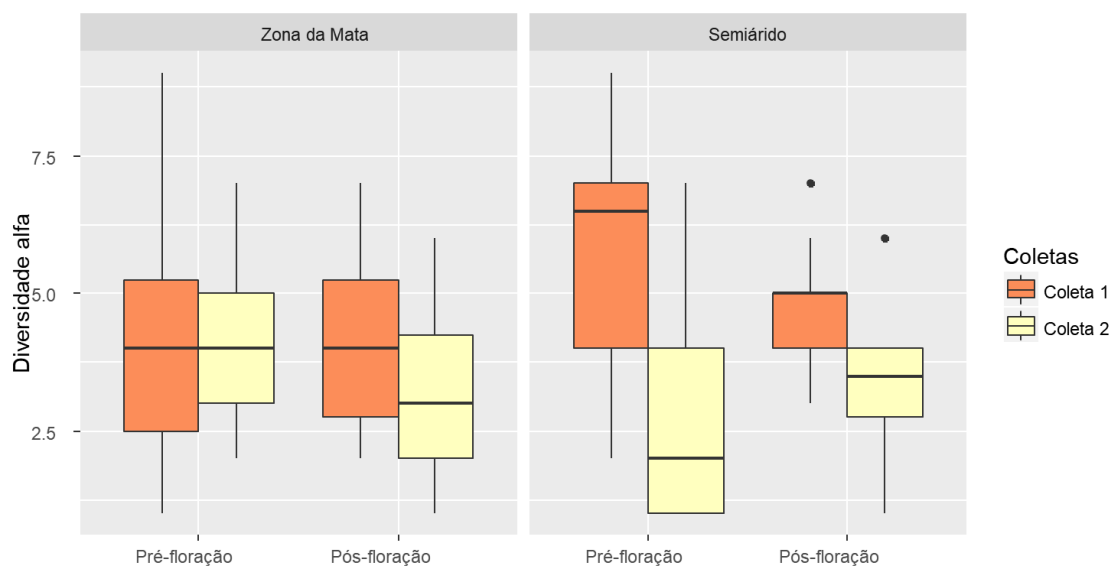
Diferenças significativas foram observadas quando comparada a diversidade alfa de fungos endofíticos entre o período fenológico na Zona da Mata e no semiárido (Figura 4). Além das diferenças observadas entre as coletas na Zona da Mata, diferenças significativas também foram observadas entre a primeira e segunda coleta no semiárido ($P = 0,001$) (Figura 4). De acordo com análise multivariada, as comunidades de fungos endofíticos diferiram estatisticamente no período de floração ($F = 3,97$, $P = 0,001$) e diferiram significativamente entre áreas (Zona da Mata e semiárido) ($F = 9,79$, $P = 0,001$) (Figura 5).

Figura 3 – Curva de acumulação de espécies utilizando o método de rarefação das espécies de fungos endofíticos isoladas pelo método dependente de cultivo, coletadas em raízes de *Sorghum bicolor* nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

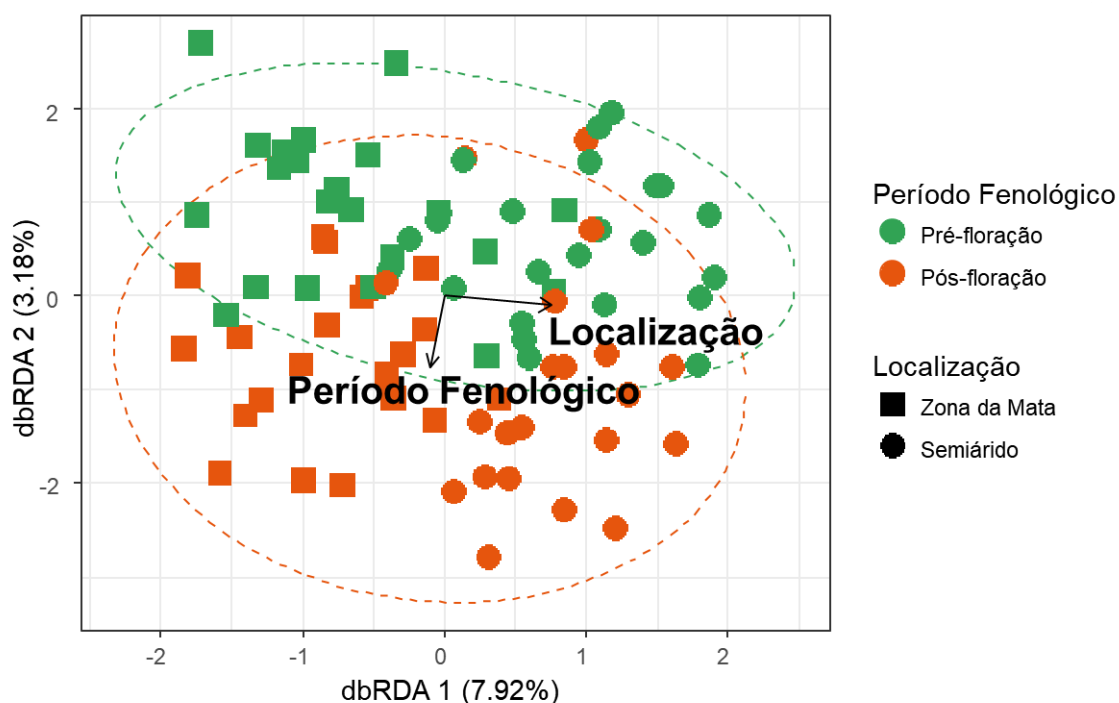
Figura 4 – Diversidade Alfa de espécies de fungos endofíticos, isoladas pelo método dependente de cultivo, em raízes de *Sorghum bicolor*, coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano, sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

Mediana (traço central), quartil (box), máximo e mínimo (pontilhados) e os outliers (círculos).

Figura 5 – Análises de Redundância entre a distribuição das espécies de fungos endofíticos isoladas pelo método dependente de cultivo, em raízes de *Sorghum bicolor*, coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano, sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

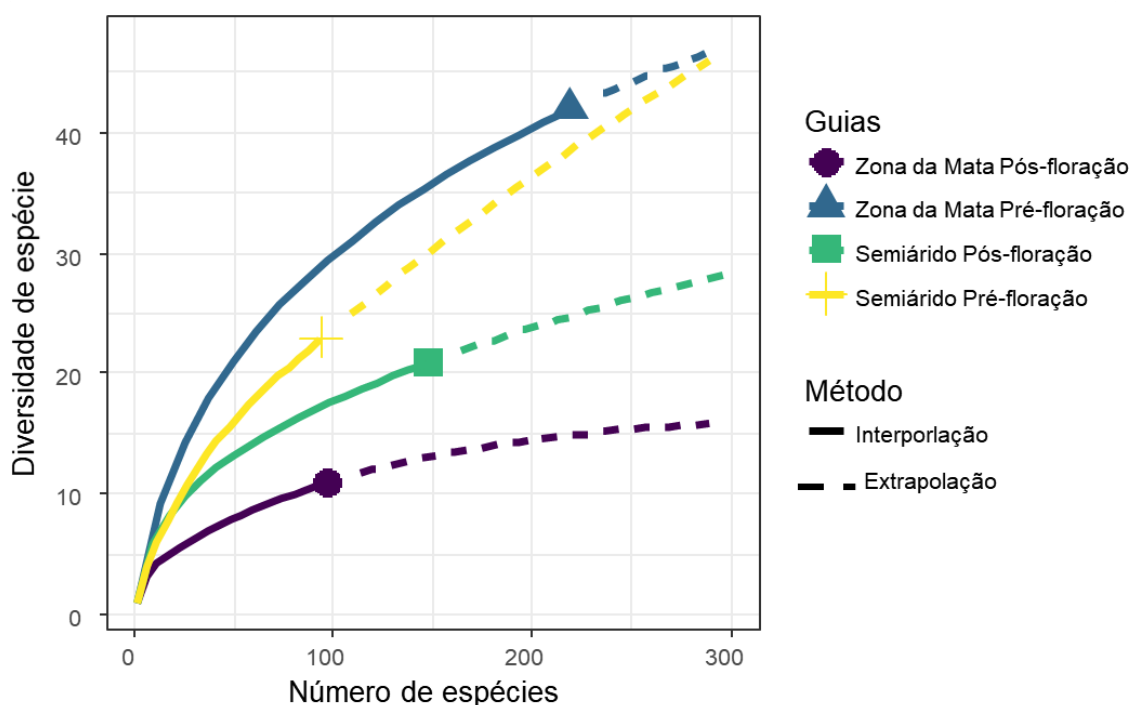
4.3 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POR MÉTODO INDEPENDENTE DE CULTIVO (ANÁLISE MOLECULAR)

Para acessar a comunidade de fungos endofíticos pelo método independente de cultivo foram obtidos 800 clones a partir de PCR direta do DNA das raízes de sorgo, sendo sequenciada a região ITS do rDNA. Após uma rigorosa triagem no qual foram retiradas as sequências com baixa qualidade, quimeras e sequências identificadas como provenientes do hospedeiro (sorgo), 558 sequências foram consideradas viáveis para o estudo, sendo usadas para construção de uma biblioteca de clones. As sequências foram agrupadas com limite de similaridade de 97% e esses agrupamentos foram classificados como OTU (Unidade Taxonômica Operacional), resultando no total de 68 OTUs. Cada sequência foi comparada com sequências depositadas no genbank através do programa Blastn do NCBI.

Na curva de acumulação de espécie, baseada no número de indivíduos, foi observado que foi possível recuperar maior diversidade de espécie no período de pré-floração em Goiana e menor diversidade no período de pós-floração também em Goiana (Figura 6).

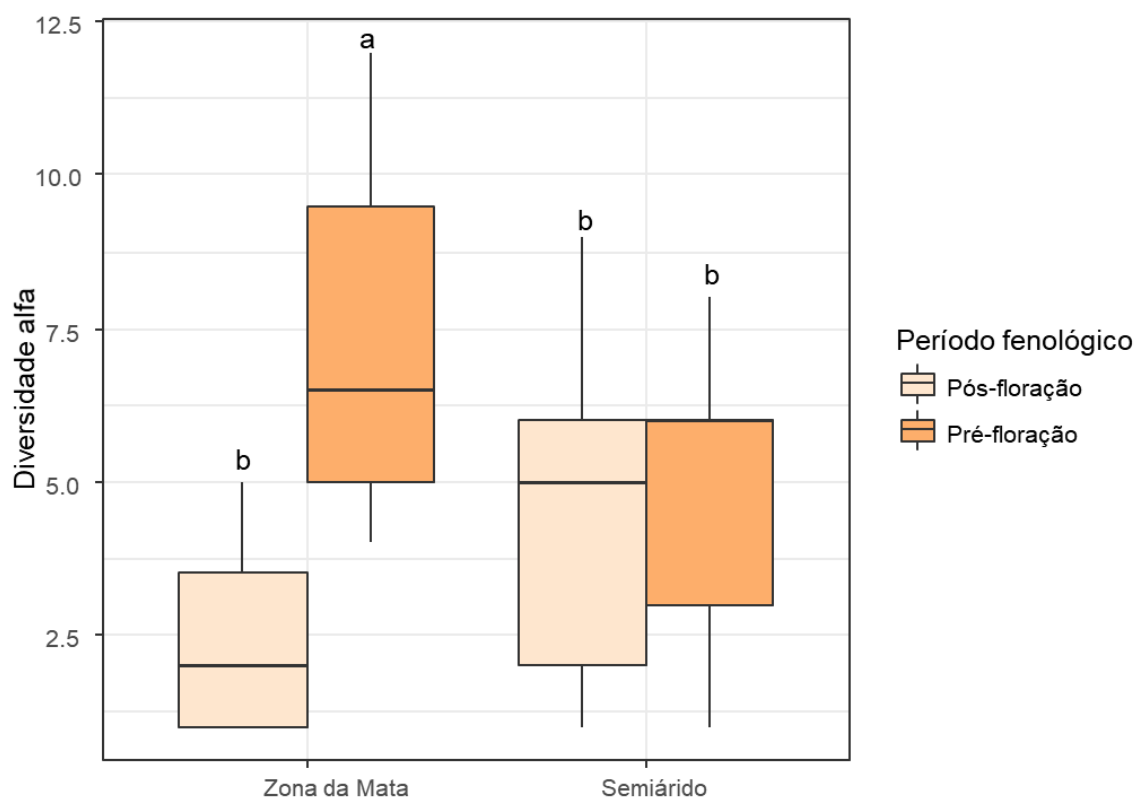
Diferenças significativas foram observadas quando comparada a diversidade alfa de fungos endofíticos entre os períodos de floração em Goiana. O período de pré-floração mostrou maior diversidade quando comparado com o período de pós-floração na Zona da Mata ($F=7,25$, $P=0,008$) (Figura 7). Em Serra Talhada não foram observadas diferenças significativas entre os períodos de floração (Figura 7). O índice de Shannon foi maior no período de pré-floração em Goiana. (Figura 8). Para os períodos de floração em Serra Talhada não houve diferença significativa no índice de Shannon (Figura 8). De acordo com análise multivariada, as comunidades de fungos endofíticos não diferiram estatisticamente no período de floração ($P=0,009$). No entanto, as comunidades apresentaram diferenças entre as áreas de coleta (Goiana e Serra Talhada) (Figura 9).

Figura 6 – Curva de acumulação de espécies utilizando o método de rarefação das espécies de fungos endofíticos identificadas pelo método independente de cultivo em raízes de *Sorghum bicolor*, coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

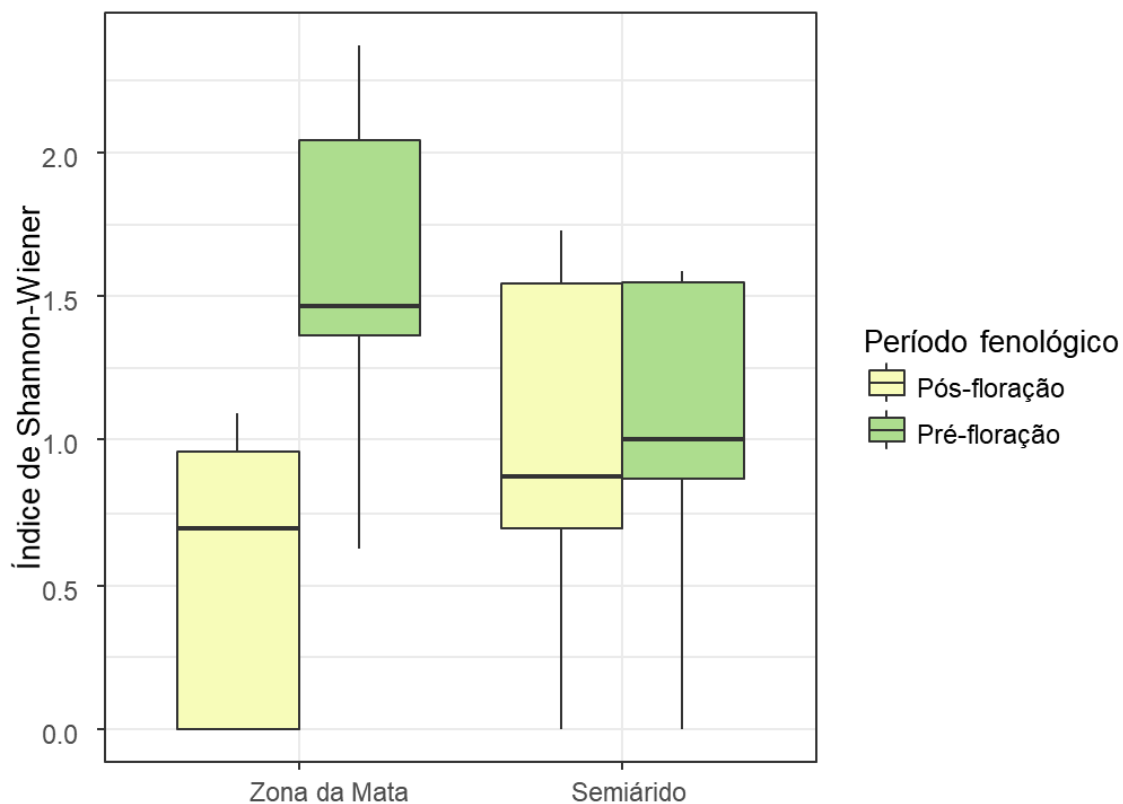
Figura 7 – Diversidade Alfa de espécies de fungos endofíticos identificadas pelo método independente de cultivo em raízes de *Sorghum bicolor*, coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano, sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

Mediana (traço central), quartil (box), máximo e mínimo (pontilhados) e os outliers (círculos).

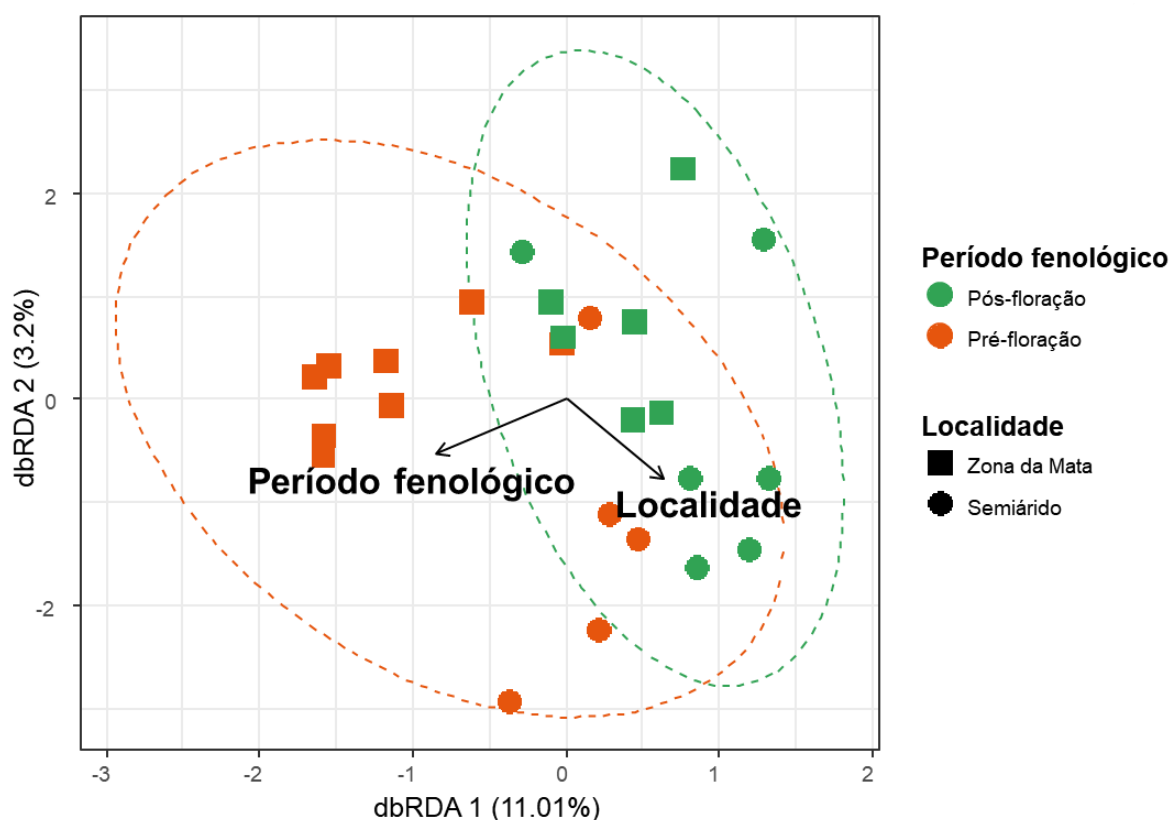
Figura 8 - Diversidade de Shannon para os fungos endofíticos identificadas pelo método independente de cultivo em raízes de *Sorghum bicolor*, coletadas nas regiões de Zona da Mata e semiárido pernambucano, sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

Mediana (traço central), quartil (box), máximo e mínimo (pontilhados) e os outliers (círculos).

Figura 9 - Análise multidimensional não-métrica (NMDS) das comunidades de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* sob diferentes períodos fenológicos nas regiões da Zona da Mata e semiárido pernambucano.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

4.4 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POR MÉTODO DEPENDENTE (ISOLAMENTO) E INDEPENDENTE DE CULTIVO (ANÁLISE MOLECULAR)

Nos fragmentos de raízes analisados (1728) foram encontrados 797 espécimes de fungos endofíticos, a partir do método dependente de cultivo, os quais estão distribuídos em 49 morfoespécies pertencentes a 25 gêneros. Representantes de todos os morfotipos foram sequenciados para a região ITS do rDNA e comparados com sequências depositadas no genbank através do programa Blastn do NCBI. A frequência absoluta e a frequência relativa foram calculadas. As espécies mais frequentes foram *Fusarium acutatum* com 149 isolados, seguido por *Fusarium solani* com 123, *Periconia macrospinoso* com 65, *Aspergillus niger* com 64 isolados e *Amesia nigricolor* com 53 isolados (Tabela 2).

Para acessar a comunidade de fungos endofíticos pelo método independente de cultivo foram obtidos 800 clones, sendo também sequenciada a região ITS do rDNA. Após uma rigorosa triagem no qual foram retiradas as sequências com baixa qualidade, quimeras

e sequências identificadas como provenientes do hospedeiro, 558 sequências foram consideradas viáveis para o estudo, sendo construída uma biblioteca de clones com 68 OTUs. Cada sequência foi comparada com sequências depositadas no *Genbank* (NCBI) através da ferramenta BLASTn do NCBI e agrupadas como OTU (Unidade Taxonômica Operacional).

Tabela 2 – Frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos identificados pelo método dependente de cultura (Isolado) e pelo método independente de cultura (OTU) em raízes de *Sorghum bicolor* em Pernambuco.

OTU	Fungo endofítico	fa	Fr (%)	Isolado ID	Fungo endofítico	fa	Fr (%)
OTU 01	Uncultured Agaricales clone HEp1c201	93	16,67	R657	<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	2	0,25
OTU 02	<i>Hortaea werneckii</i>	1	0,18	R100 (=OTU 28)	Uncultured <i>Phoma</i>	6	0,75
OTU 03	<i>Ceratobasidium</i> sp.	12	2,15	R101	<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i>	1	0,13
OTU 04 (=R667)	<i>Fusarium acutatum</i>	112	20,07	R102 (=OTU 17)	Uncultured <i>Humicola</i>	2	0,25
OTU 05 (=R50)	<i>Fusarium oxysporum</i>	21	3,76	R103	<i>Penicillium reticulisporum</i>	2	0,25
OTU 06	<i>Talaromyces thailandensis</i>	14	2,51	R1052 (=OTU 55)	<i>Macrophomina phaseolina</i>	12	1,51
OTU 07 (=R286)	<i>Gelasinospora tetrasperma</i>	9	1,61	R1069	<i>Penicillium javanicum</i>	1	0,13
OTU 08 (=R58)	<i>Fusarium</i> sp.	6	1,08	R1115	<i>Trichoderma harzianum</i>	1	0,13
OTU 09	<i>Clydaea vesicula</i>	4	0,72	R113	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1	0,13
OTU 10	Uncultured <i>Epicoccum</i>	2	0,36	R171	<i>Talaromyces assiutensis</i>	2	0,25
OTU 11 (=R599)	<i>Periconia macrospinosa</i>	6	1,08	R172 (=OTU 65)	<i>Pseudophialophora panicorum</i>	1	0,13
OTU 12	<i>Phaeosphaeriopsis musae</i>	2	0,36	R174 (=OTU 19)	Uncultured Sordariales clone HEp2c241	4	0,50
OTU 13	<i>Acrophialophora fusispora</i>	1	0,18	R175	<i>Amesia nigricolor</i>	53	6,65
OTU 14	<i>Myceliophthora verrucosa</i>	2	0,36	R219	<i>Mucor indicus</i>	8	1,00
OTU 15	Fungal sp.	1	0,18	R223	<i>Setosphaeria rostrata</i>	10	1,25
OTU 16	Uncultured root-associated fungus	1	0,18	R256 (=OTU 51)	<i>Fusarium verticillioides</i>	2	0,25
OTU 17 (=R102)	Uncultured <i>Humicola</i>	2	0,36	R261	Uncultured fungus	32	4,02
OTU 18 (=R82)	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-A isolate Rh228	4	0,72	R286 (=OTU 07)	<i>Gelasinospora tetrasperma</i>	27	3,39
OTU 19 (=R174)	Uncultured Sordariales clone HEp2c241	28	5,02	R30 (=OTU 43)	<i>Chaetomium megalocarpum</i>	12	1,51
OTU 20	Uncultured soil fungus	1	0,18	R306	<i>Penicillium oxalicum</i>	1	0,13
OTU 21 (=R992)	<i>Fusarium solani</i>	11	1,97	R317	<i>Aspergillus rugulosus</i>	8	1,00
OTU 22	Uncultured <i>Ceratobasidium</i> clone T18DA2	6	1,08	R321	<i>Aspergillus clavatonanicus</i>	1	0,13
OTU 23	Uncultured soil fungus clone 151b32	3	0,54	R335	<i>Talaromyces atroroseus</i>	4	0,50
OTU 24	<i>Corynascella humicola</i>	4	0,72	R352 (=OTU 57)	<i>Achroistachys levigata</i>	38	4,77

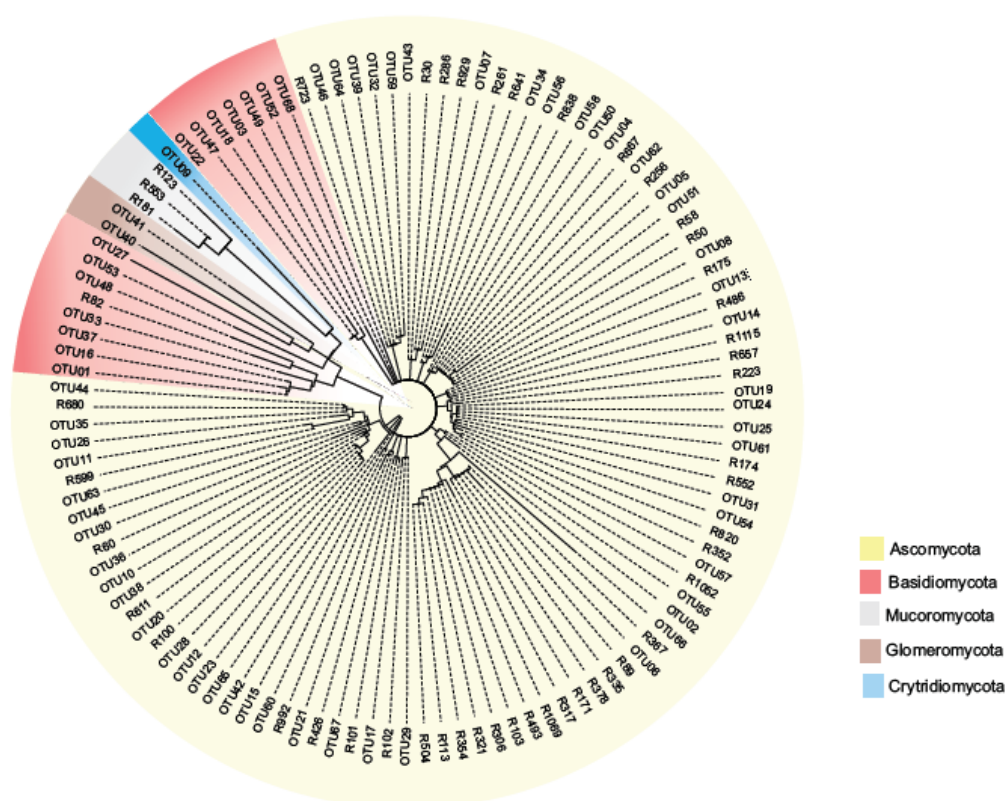
OTU 25	Uncultured Sordariales clone 8WF1cf09	2	0,36	R354	<i>Aspergillus niger</i>	64	8,03
OTU 26	<i>Latorua caligans</i>	1	0,18	R367	<i>Talaromyces</i> sp.	1	0,13
OTU 27	<i>Metschnikowia saccharicola</i>	2	0,36	R378	Fungal sp.	20	2,51
OTU 28 (=R100)	Uncultured <i>Phoma</i>	2	0,36	R426	<i>Xylaria</i> sp.	3	0,38
OTU 29	Uncultured endophytic	12	2,15	R493	<i>Penicillium menonorum</i>	1	0,13
OTU 30	Uncultured Ascomycota	4	0,72	R498	<i>Aspergillus terreus</i>	4	0,50
OTU 31	Uncultured Ascomycota clone 20	1	0,18	R50 (=OTU 05)	<i>Fusarium oxysporum</i>	18	2,26
OTU 32	<i>Zopfiella</i> sp.	2	0,36	R504	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	4	0,50
OTU 33	Uncultured <i>Cryptococcus</i>	1	0,18	R522	<i>Striaticonidium brachysporum</i>	1	0,13
OTU 34	Uncultured fungus	34	6,09	R553	<i>Mucor irregularis</i>	2	0,25
OTU 35	<i>Pleosporales</i> sp.	10	1,79	R58 (OTU 08)	<i>Fusarium</i> sp.	1	0,13
OTU 36	<i>Setophoma terrestris</i>	1	0,18	R599 (OTU 11)	<i>Periconia macrospinosa</i>	65	8,16
OTU 37	<i>Marasmius brunneoaurantiacus</i>	5	0,90	R60	<i>Curvularia eragrostidis</i>	48	6,02
OTU 38	Uncultured Ascomycota clone MO1	1	0,18	R611	<i>Setophoma terrestris</i>	1	0,13
OTU 39	Uncultured fungus	1	0,18	R641 (=OTU 56)	Uncultured Sordariales	9	1,13
OTU 40	<i>Dentiscutata heterogama</i>	1	0,18	R667	<i>Rhizopus oryzae</i>	7	0,88
OTU 41	<i>Rhizoglosum aggregatum</i>	1	0,18	R667 (=OTU 04)	<i>Fusarium acutatum</i>	149	18,70
OTU 42	Uncultured soil	1	0,18	R680	Uncultured Pleosporales	1	0,13
OTU 43 (=R30)	<i>Chaetomium megalocarpum</i>	2	0,36	R723	<i>Albifimbria terrestris</i>	1	0,13
OTU 44	Uncultured Pleosporales	1	0,18	R82 (=OTU 18)	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-A isolate Rh228	2	0,25
OTU 45	Uncultured fungus	2	0,36	R820	<i>Sarocladium</i> sp.	1	0,13
OTU 46	Uncultured fungus clone FA3-O19	1	0,18	R838	<i>Xenomyrothecium tongaense</i>	1	0,13
OTU 47	Uncultured Ceratobasidiaceae clone DOF	5	0,90	R89	<i>Talaromyces pinophilus</i>	49	6,15
OTU 48	Uncultured Agaricales	6	1,08	R929	<i>Neurospora intermedia</i>	1	0,13
OTU 49	<i>Exophiala spinifera</i>	18	3,23	R992 (=OTU 21)	<i>Fusarium solani</i>	112	14,05
OTU 50	Uncultured Ascomycota clone 1029	21	3,76				
OTU 51 (=R256)	<i>Fusarium verticillioides</i>	3	0,54				
OTU 52	Uncultured Entoloma	15	2,69				

OTU 53	Uncultured basidiomycetes	1	0,18				
OTU 54	<i>Podospora dimorpha</i>	4	0,72				
OTU 55 (=R1052)	<i>Macrophomina phaseolina</i>	1	0,18				
OTU 56 (=R641)	Uncultured Sordariales	1	0,18				
OTU 57 (=R352)	<i>Achroistachys levigata</i>	1	0,18				
OTU 58	Uncultured Zopfiella	1	0,18				
OTU 59	Uncultured fungus	31	5,56				
OTU 60	<i>Fusarium neocosmosporiellum</i>	5	0,90				
OTU 61	Uncultured fungus	2	0,36				
OTU 62	<i>Gibberella thapsina</i>	3	0,54				
OTU 63	Uncultured Hypocreales	1	0,18				
OTU 64	Uncultured fungus	1	0,18				
OTU 65 (=R172)	<i>Pseudophialophora panicorum</i>	1	0,18				
OTU 66	<i>Ascomycota</i> sp.	1	0,18				
OTU 67	<i>Coniocessia nodulisporioides</i>	1	0,18				
OTU 68	<i>Rhizoctonia solani</i>	1	0,18				
Total		558	100	Total		797	100

Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

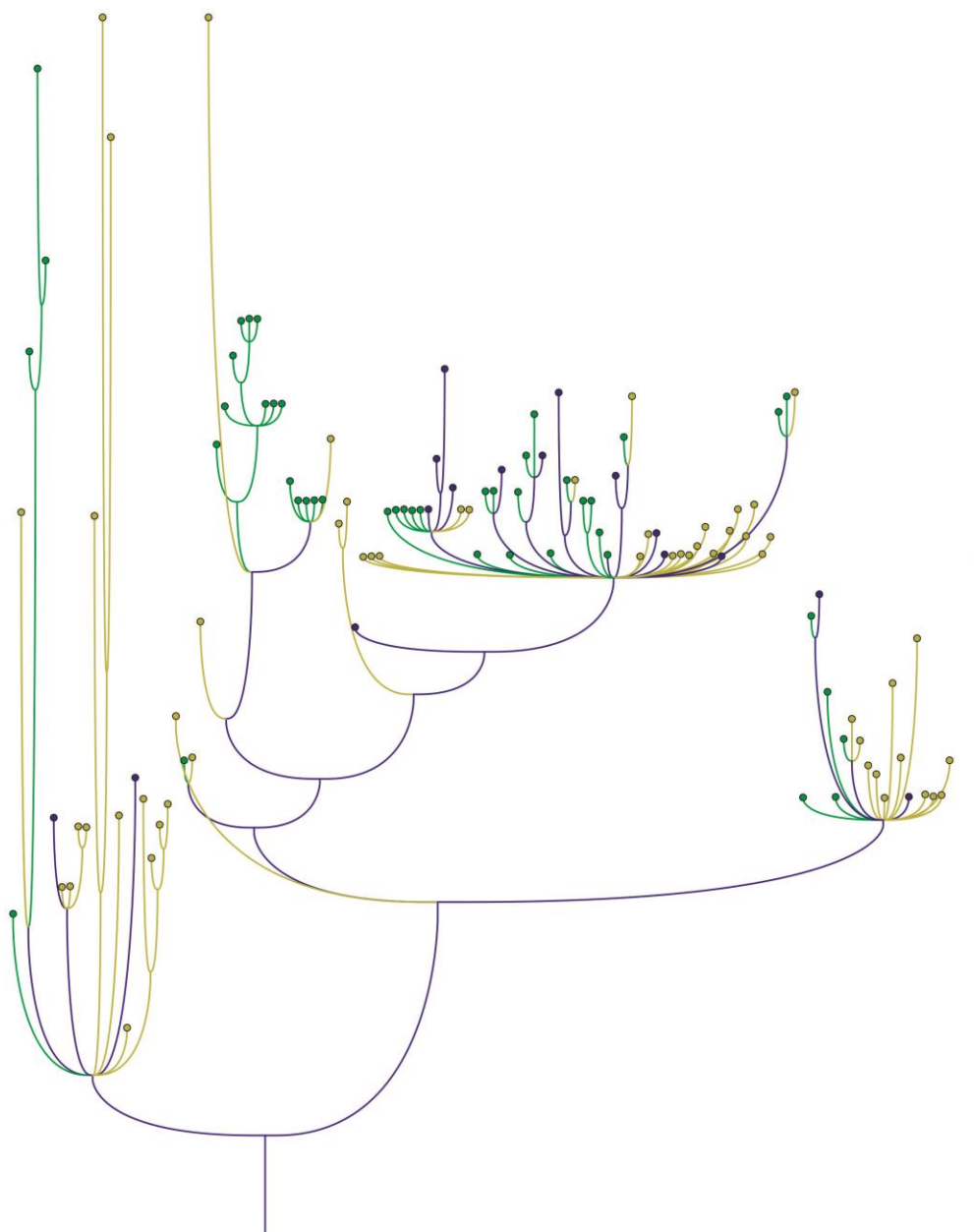
A reconstrução filogenética foi realizada utilizando todas as sequências viáveis geradas no estudo, tanto aquelas oriundas do método independente de cultivo (OTUs) quanto as obtidas a partir do método dependente de cultivo (representados por “R”). Na árvore filogenética as sequências agruparam-se em cinco grandes grupos identificados como Ascomycota, Basidiomycota, Mucorales, Glomerales e Chytridiomycota (Figura 10). Crytridiomycota e Glomeromycota são representados exclusivamente por clones (OTU) obtidos pelo método independente de cultivo. Resultado similar foi observado com Basidiomycota com exceção do isolado R 82 identificado como *Ceratobasidium* sp., que foi recuperado tanto pelo método dependente quanto independentemente de cultivo (Tabela 2). De forma geral, alguns taxa são observados apenas quando utilizados método independente ou dependente de cultivo (Figura 11).

Figura 10 – Reconstrução filogenética via Neighbour-Joining utilizando sequências do 5.8s rDNA das OTUs (método independente de cultivo) e dos isolados “R” (método dependente de cultivo).



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

Figura 11 – Reconstrução filogenética a partir de análise bayesiana, utilizando sequências do 5.8s rDNA. Ramos verdes representam espécies recuperadas pelo método de isolamento dependente de cultivo, ramos amarelos representam espécies recuperadas pelo método independente de cultivo e ramos azuis representam espécies recuperadas nos dois métodos.



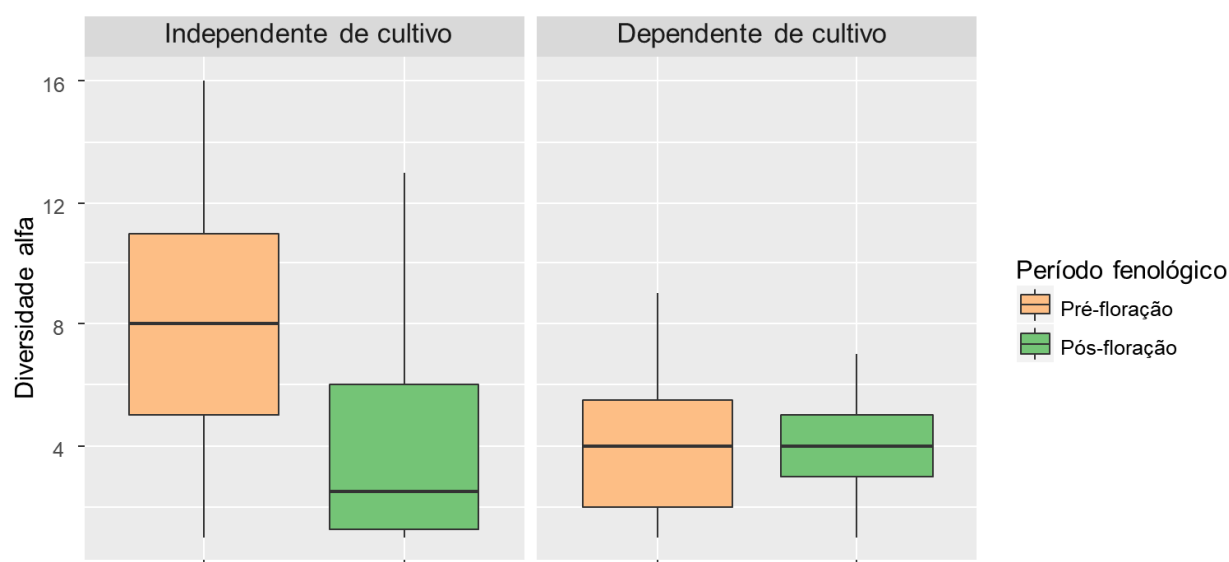
Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

As comunidades de fungos endofíticos foram estruturadas principalmente pelo método aplicado (dependente e independente de cultivo) e não pela localização ou período fenológico em que foram recuperadas. Diferenças significativas para o período de floração

só foram observadas utilizando índice de Shannon e diversidade alfa de fungos endofíticos com relação ao método independente de cultivo ($F=18,24$, $P<0,001$) (Figura 12 e 13).

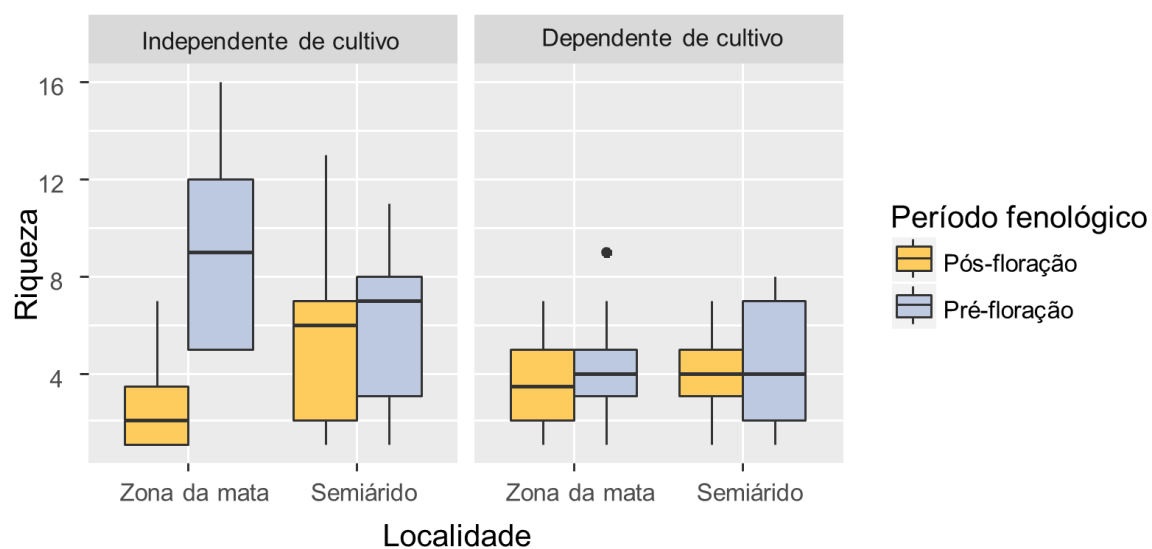
Para melhor entender o comportamento da comunidade de fungos endofíticos foi realizada a análise multivariada considerando o método de identificação (dependente e independente de cultivo), área de coleta (Goiana e Serra Talhada) e o período de floração (pré e pós-floração) (Figura 14). A estrutura da comunidade diferiu significativamente de acordo com o método utilizado para detecção dos fungos ($F=9,54$, $P=0,0001$) e local de coleta ($F=9,34$, $P=0,001$). Por outro lado, as comunidades não diferiram entre os períodos de pré e pós-floração ($F=4,45$, $P=0,001$) (Figura 14).

Figura 12 – Diversidade Alfa de espécies de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* detectadas pelo método dependente e independente de cultivo sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.



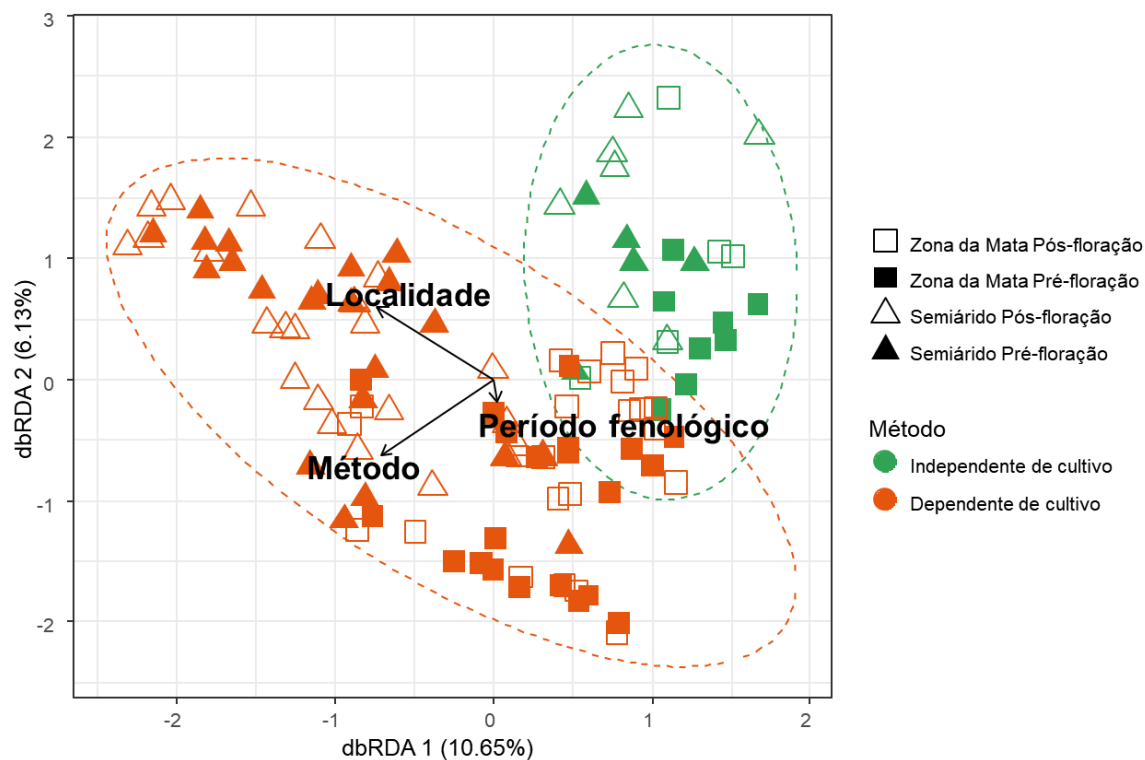
Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

Figura 13 – Riqueza de espécies de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* detectadas pelo método dependente e independente de cultivo nas regiões da Zona da Mata e semiárido pernambucano sob diferentes períodos fenológicos: Pré-floração e Pós-floração.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

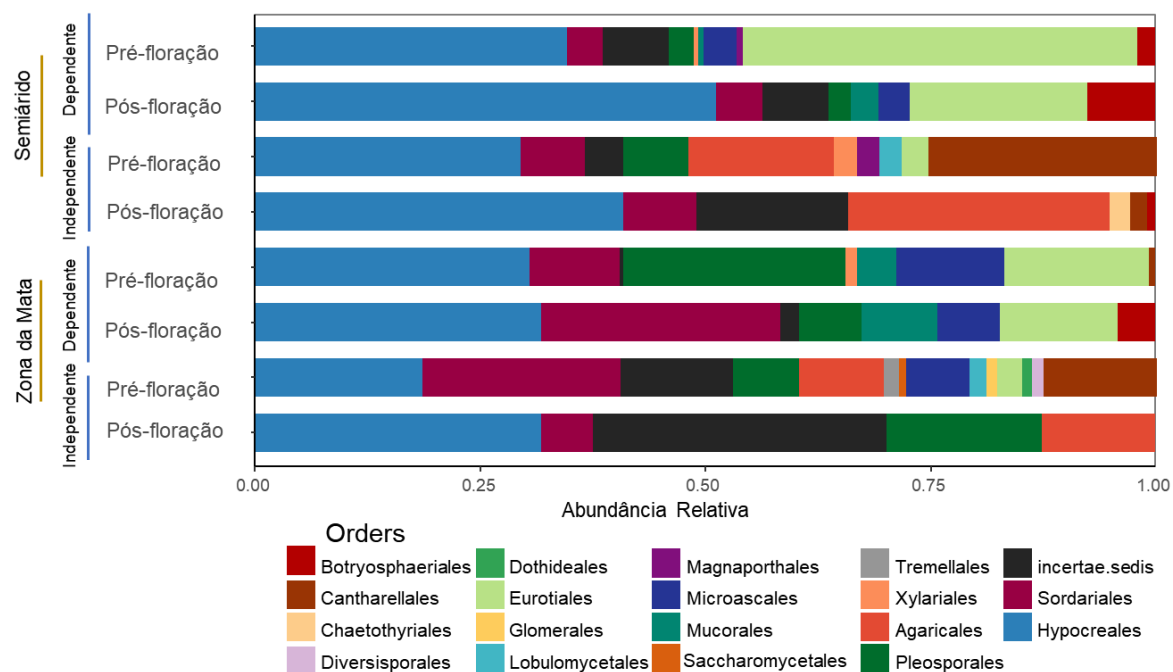
Figura 14 - Análise multidimensional não-métrica (NMDS) das comunidades de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* sob diferentes períodos fenológicos nas regiões da Zona da Mata e semiárido pernambucano.



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

Considerando os métodos de obtenção das sequências (dependente e independente de cultivo) foi observada maior abundância relativa para fungos Hypocreales, seguido por Sordariales (Figura 15). Táxons que não foram enquadrados em nenhuma ordem conhecida foram classificados como *incertae sedis*, onde foi possível observar uma alta abundância relativa principalmente quando utilizado o método independente de cultivo. Além de apresentar uma considerável abundância relativa, a ordem Agaricales ocorreu quase que exclusivamente quando utilizando o método independente de cultivo, entretanto Eurotiales foi mais abundante quando utilizado o método dependente de cultivo (Figura 15).

Figura 15 – Perfil da comunidade de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor* com base na riqueza de táxons (por ordem) de acordo com o método (dependente de cultivo), período fenológico (pré e pós-floração) e local de coleta (Zona da Mata e semiárido).



Fonte: (Rafael Oliveira, 2018)

5 DISCUSSÃO

Com base nas análises das OTUs recuperadas a partir de sequências obtidas pelos métodos independente e dependente de cultivo, foi registrada alta diversidade, considerado o elevado número de táxons encontrados (101). Além disso, foi possível recuperar representantes de todos os grandes grupos de fungos. Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota e Glomeromycota, os quais são os principais filos comumente ocorrentes como endofíticos, espécies de Chytridiomycota são raramente reportadas como endofíticos devido sua dificuldade de crescer em meio de cultura artificiais (JIN et al., 2015). O clone OTU 09 foi o único representante de Chytridiomycota e constitui o primeiro relato do filo em sorgo, sendo somente possível recuperar esse organismo através do método independente de cultivo.

Embora representantes de FMA não sejam comumente reportados em trabalhos de diversidade de fungos endofíticos, duas OTUs foram identificadas como sendo pertencentes às ordens Diversisporales e Glomerales. Com a utilização da sequência completa da região ITS do rDNA foi possível identificar em nível específico muitos

isolados e OTUs nesse estudo. A diversidade de fungos micorrizicos arbusculares (FMA) é estimada a partir da recuperação de esporos no solo, pois os mesmos são biotróficos obrigatórios (SCHÜßLER et al., 2001) e esses organismos não se desenvolvem em meios artificiais. O clone OTU 41, identificado como *Rhizoglyphus aggregatus* (= *Glomus aggregatum*) é conhecido por promover o crescimento de plantas (GARAMPALLI et al., 2005) no Senegal, esse fungo foi capaz de estimular o crescimento de vegetais (DUPONNOISA et al., 2001), além de melhorar a aeração do solo e o vigor da planta hospedeira (PHILLIPS, 2017).

Considerando apenas o método dependente de cultivo foi observada uma taxa de colonização de 46,12%, considerada dentro da média quando comparada com outros estudos. Em pesquisa com arroz (*Oryza rufipogon*), Wang et al. (2015) observaram uma taxa de colonização de 31% para fungos isolados de raízes. Números inferiores (23%) também foram reportado por Yuan et al. (2010) em raízes de uma espécie de arroz selvagem (*Oryza granulate*). Larran et al. (2007) obtiveram uma taxa de colonização de 28,2% em folhas de aveia, porém em caules e grãos essa taxa subiu para 41,9% e 76,4%, respectivamente.

Uma nova espécie de *Pseudophialophora*, *P. sorghi* (Crous et al. 2017), foi encontrada tanto pelo método independente de cultivo (OTU 68), quanto pelo método de isolamento em cultivo (R172). Todas as espécies de *Pseudophialophora* foram isoladas de raízes de gramíneas (Poaceae) aparentemente sadias (LUO et al. 2014; 2015). Pouco se sabe sobre a função ecológica das espécies de *Pseudophialophora*. Na descrição do gênero, Luo et al. (2014) classificou as espécies como de função ecológica desconhecida. No entanto, Luo et al. (2015), investigando a interação espécies de *Pseudophialophora* com plantas, observaram que vários táxons podem diminuir o crescimento da planta quando inoculado em raízes de *Panicum virgatum*, considerando que são prováveis patógenos desse vegetal. *Panicum virgatum* é um promissor produtor de biocombustível nos EUA, assim como o sorgo no Brasil. Apesar das observações de Luo et al. (2015) em relação a outras espécies de *Pseudophialophora*, estudos são necessários para investigar uma possível capacidade patogênica de *P. sorghi* em raízes de sorgo. Além disso, essa é a primeira ocorrência do gênero para regiões tropicais.

Neste estudo foi investigada a influência da localidade (Zona da Mata e semiárido) e o período fenológico (Pré e Pós-floração) na diversidade e composição da comunidade de fungos endofíticos com base no isolamento de fungos em meio de cultura (dependente de cultivo) e a partir de PCR direta e posterior clonagem (independente de cultivo). É possível

observar que de acordo com as curvas de acumulação de espécies mais endófitos poderiam ser encontrados. Dependendo do esforço amostral essa curva pode variar, no entanto quase todos os estudos sobre fungos endofíticos não conseguiram atingir o número de espécies estimadas (YUAN et al., 2010; BEZERRA et al., 2013; MASSIMO et al., 2015). Variação no número de espécie foi observada entre os locais de coleta, bem como nos períodos fenológicos quando foi utilizando o método dependente de cultivo. Por outro lado, uma maior variação foi observada quando utilizado o método independente de cultivo. Maior número de espécies foi observado na Zona da Mata no período de pré-floração.

A diferença significativa na diversidade de endófitos foi verificada entre os períodos fenológico, no entanto foi observada principalmente na Zona da Mata, quando utilizado o método independente de cultivo. O período de pós-floração apresentou maior riqueza de espécie quando comparado com o período de pré-floração. Estudos investigando a influência do período de floração na comunidade de fungos endofíticos são escassos. Dalal & Kulkarni (2014) observaram que a comunidade de fungos endofíticos em raízes e folhas de soja é influenciada pelos estádios de desenvolvimento da planta. Foi observada uma diminuição na riqueza de espécies do estágio vegetativo para o estágio de floração em raízes de trigo (GDANETZ & TRAIL et al., 2017). A população de fungos diminuiu de acordo com o estágio vegetativo. Em *Centaurea stoebe*, os efeitos dos endófitos foram observados em todos os estádios de crescimento desde a germinação até a floração (NEWCORBE et al., 2009). Segundo Oono et al. (2015) a especialização simbiótica associada à maturidade da planta pode ser comum. Nas análises multivariadas, as comunidades de fungos endofíticos não diferiram no período de floração, mas diferiram nas áreas estudadas (Zona da Mata e semiárido). Vários estudos vêm mostrando que existe influência geográfica na comunidade de fungos endofíticos, desde a influência da frequência de fungos entre ilhas (Helander et al., 2007) até em escala continental (REN et al., 2012). A localização geográfica do hospedeiro vegetal pode ser um dos principais determinantes da composição da comunidade endofítica (CHRISTIAN et al., 2016). Segundo Collado et al. (1999), a distribuição de fungos endofíticos é mais significativa quando considerado o fator geográfico quando há sazonalidade. Isso pode explicar a diferença significativa entre Zona da Mata e semiárido e que essa diferença deve ter maior influência da distância entre os locais de coleta e o clima. As espécies endofíticas mais frequentes no estudo foram comuns tanto na Zona da Mata quanto no semiárido, enquanto alguns táxons raros foram específicos para cada local. Resultado semelhante foi observado por Wu et al. (2013), onde os táxons dominantes mostraram heterogeneidade espacial e

muitos táxons de fungos com baixa frequência foram específicos para uma localidade. Diante disso, acredita-se que algumas espécies raras ocorreram apenas na Zona da Mata devido à barreira geográfica (distância entre as áreas).

O modelo de distribuição de isolados das ordens fúngicas não determinou nenhum padrão entre os locais de coleta (Zona da Mata e semiárido) e o período fenológico (pré e pós-floração). Isolados agrupados em Hypocreales foram os mais comuns devido ao alto número de ocorrência de espécies de *Fusarium*. Segundo Jin et al. (2015) membros da família Nectriaceae foram dominantes em *Stellera chamaejasme* devido ao grande número de sequências de *Fusarium*. Resultado semelhante também foi observado por Dalal & Kulkarni (2014) em raízes, folhas e caules de soja e milho (Bokati et al., 2016). Por outro lado, diferenças entre a ocorrência das ordens foram observadas quando comparamos o método de recuperação da comunidade endofítica. Membros da ordem Eurotiales foram dominantes no método dependente de cultivo (Figura 15), por outro lado representantes de Agaricales foram observados apenas quando utilizado o método independente de cultivo, com exceção do isolado R 87 identificado como *Ceratobasidium* sp. que foi detectados nos dois métodos. Esse fato ocorre devido à dificuldade de muitas espécies de Agaricales crescerem em meio de cultura. Maior ocorrência de táxons de Basidiomycota pode ser observada em estudos com fungos endofíticos utilizando métodos independentes de cultivo (JIN et al., 2015; GDANETZ; TRAIL, 2017).

Algumas sequências não foram identificadas, sendo classificadas como *incertae sedis*. Na maioria dos casos, acredita-se que para uma espécie de fungo ser considerada nova é preciso que tenha similaridade menor que 97 % com outras presentes no banco de dados do NCBI (KOLJALG et al., 2013). No presente estudo foram obtidas 19 sequências com valores iguais ou inferiores a essa porcentagem, ou seja, muitas dessas sequências são de espécies até então desconhecidas para ciência, ou que ainda não foram depositadas em bancos de dados. Alguns fungos que são biotróficos e não podem ser cultivados passam despercebidos em estudos que usam exclusivamente métodos dependentes de cultivo (YURKOV et al., 2011).

Foi observada diferença significativa com relação a comunidade de fungos endofíticos de acordo com o método de obtenção das sequências (dependente de cultivo e independente de cultivo), demonstrando que é possível recuperar muitos táxons que não são capazes de crescer em meio de cultivo. Trabalhos como esse visam contribuir para o conhecimento de uma comunidade de fungos pouco conhecida. No geral, estudos que utilizam métodos independentes de cultivo apresentam alta diversidade de fungos

endofíticos (FONSECA-GARCÍA1 et al., 2016). Segundo Sun et al. (2012) devido às limitações das técnicas tradicionais de isolamento, é provável que alguns ou mesmo inúmeros fungos endofíticos nunca sejam isolados. Além disso, estudos como esse podem elucidar a diversidade e distribuição de uma biodiversidade escondida (BARNES et al., 2016).

Embora muitos táxons tenham sido recuperados apenas pelo método independente de cultivo, também foram observadas espécies encontradas apenas a partir do método dependente de cultivo. Segundo Raja (2017), sempre que possível, a identificação de fungos deve ser feita usando uma combinação de caracteres morfológicos, culturais e moleculares. É possível que no futuro as espécies sejam identificadas apenas a partir das amostras de sequências ambientais. Existe, portanto, uma necessidade de ligar sequências de DNA a um método efetivo de nomeação (YAHR et al., 2016). Isso é importante para solucionar os problemas de táxon que são classificados como *incertae sedis*, mas ainda é preciso diálogo entre as comunidades científicas para encontrar uma melhor solução.

Esse é o primeiro estudo que analisa a comunidade de fungos endofíticos em sorgo através de técnicas tradicionais de cultivo e da construção de uma biblioteca de clones para avaliar a comunidade de fungos diretamente do vegetal independente de cultivo. Além disso, esse estudo representa contribuição para o conhecimento de uma comunidade de fungos até então desconhecida e que servirá para futuros estudos relacionados com programas de controle de doenças e pragas, além de melhorias no desenvolvimento de plantas de interesse econômico, como o sorgo.

6 CONCLUSÕES

- Raízes de *Sorghum bicolor* possuem elevada diversidade de fungos endofíticos;
- Raízes de *Sorghum bicolor* abrigam espécies de fungos endofíticos raros e/ou desconhecidos para a ciência;
- A comunidade de fungos endofíticos de sorgo difere significativamente de acordo com o período fenológico do sorgo estudado;
- A comunidade de fungos endofíticos difere dependendo do local de coleta;
- O método independente de cultivo permite o acesso a táxons de fungos endofíticos que possivelmente não crescem em meios de cultivo;
- O uso de diferentes métodos de recuperação de espécies é importante para melhor conhecimento da comunidade de fungos endofíticos em raízes de *Sorghum bicolor*;

REFERÊNCIAS

- ADEYEYE, E.I.; ADESINA, A.J. Enhancement of lipid quality of raw guinea corn (*Sorghum bicolor*) grains through germination and steeping. **Open J Analyt Chem Res**, v.1, n.1, p.5-17, 2013.
- AFKHAMI, M.E. Fungal endophyte–grass symbioses are rare in the California floristic province and other regions with Mediterranean-influenced climates. **Fungal Ecology**, v.5, n.3, p.345-352, 2012.
- ALBUQUERQUE, C.J.B.; MANTOVANI, E.C.; MENEZES, C.B.; TARDIN, F.D.; FREITAS, R.S.; MAY, A.; ZANDONADI, C.H.S. Sorgo granífero: manejo, colheita e armazenamento. **Informe Agropecuário**, v.35, n.278, p.41-48, 2014.
- AL-YAHYA'EI, M.N. et al. Unique arbuscular mycorrhizal fungal communities uncovered in date palm plantations and surrounding desert habitats of Southern Arabia. **Mycorrhiza**, v.21, n.3, p.195-209, 2011.
- APPOLONI, S. et al. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). **Microbial Ecology**, v.56, n.4, p.649-659, 2008.
- ARAÚJO, W. L. et al. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. **Piracicaba: Calq**, v. 1, p. 86p, 2002.
- ARNOLD, A.E. et al. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v.99, n.2, p.185-206, 2007.
- AVINASH, K.S. et al. Antimicrobial Potential of Crude Extract of *Curvularia lunata*, an Endophytic Fungi Isolated from *Cymbopogon caesius*. **Journal of Mycology**, v.2015, p.1-4, 2015.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. **Fungi: multifaceted microbes**. CRC press, Boca Raton, p.189-207, 2007.
- AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p.15-16, 2000.
- BACON, C.W. et al. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. **Applied and environmental microbiology**, v.34, n.5, p.576-581, 1977.
- BACON, C.W.; WHITE, J.R.; JAMES F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. **Symbiosis**, v.68, n.1-3, p.87-98, 2016.
- BARELLI, L. et al. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. **Plant molecular biology**, v.90, n.6, p.657-664, 2016.

BARNES, Christopher J. et al. Unexpectedly high beta-diversity of root-associated fungal communities in the Bolivian Andes. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1377, 2016.

BEGUM, S.R.; TAMILSELVI, K.S. Endophytes are Plant Helpers: An Overview. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v.5, n.4, p.424-436, 2016.

BELLEGARD, S.E. et al. Natural enemies of the South American pampas grasses *Cortaderia* spp. in New Zealand. In: **17th Australasian weeds conference. New frontiers in New Zealand: together we can beat the weeds. Christchurch, New Zealand, 26-30 September, 2010**. New Zealand Plant Protection Society, p.239-242, 2010.

BEZERRA, Jadson DP et al. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, v. 60, n. 2, p. 53-63, 2013.

BISHT, RINKY; SHARMA, DEEKSHA; AGRAWAL, PAVAN KUMAR. Antagonistic and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from needle of *Cupressus torulosa* D. Don. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 9, n. 3, p. 282-288, 2016.

BLAXTER, M. et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.360, n.1462, p.1935-1943, 2005.

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.

CESARO, P. et al. Preferential colonization of *Solanum tuberosum* L. roots by the fungus *Glomus intraradices* in arable soil of a potato farming area. **Applied and environmental microbiology**, v.74, n.18, p.5776-5783, 2008.

CLAY, K. et al. Diversity of fungal endophytes in non-native *Phragmites australis* in the Great Lakes. **Biological Invasions**, p.1-14, 2016.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p.275-297, 1990.

CLAYTON, W. D. (79) Proposal to Conserve the Generic Name *Sorghum* Moench (Gramineae) versus *Sorgum* Adans.(Gramineae). **Taxon**, v. 10, n. 8, p. 242-243, 1961.

COMBY, M. et al. Spatial and Temporal Variation of Cultivable Communities of Co-occurring Endophytes and Pathogens in Wheat. **Frontiers in microbiology**, v.7, 2016.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Perspectivas para a agropecuária/Companhia Nacional de Abastecimento, Conab, 2015. **Perspec. agropec**.3:1-128.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira grãos. **Acesso em**, v. 4, 2017a.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira grãos. **Acesso em**, v. 5, 2017b.

COLLADO, J. et al. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. **The New Phytologist**, v. 144, n. 3, p. 525-532, 1999.

COȘOVEANU, Andreea et al. Active fungal endophytes against phytopathogenic fungi-dwellers of Romanian and Canarian artemisia spp. **Scientific Papers-Series B, Horticulture**, n. 60, p. 291-298, 2016.

COSTA, R.Q. Fenologia e análise de crescimento do sorgo forrageiro Volumax em Vitória da Conquista-BA. **Dissertação. Vitória da Conquista Bahia-Brasil**. 2013.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 625–715. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 2017.

DALAL, J. M.; KULKARNI, N. S. Population Variance and Diversity of Endophytic Fungi in Soybean (*Glycine max* (L) Merrill). **Research and Reviews: Journal of Botanical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 33-39, 2014.

DECKERT, R.J.; MELVILLE, L.H.; PETERSON, R.L. Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life-cycle phase in the foliage of *Pinus strobus*. **Mycological Research**, v.105, n.08, p.991-997, 2001.

DING, G. et al. Photinides A– F, Cytotoxic Benzofuranone-Derived γ -Lactones from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis photiniae*. **Journal of natural products**, v.72, n.5, p.942-945, 2009.

DUPONNOIS, Robin; PLENCHETTE, Christian; BÂ, Amadou M. Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *Glomus aggregatum* in Senegal. **European Journal of Soil Biology**, v. 37, n. 3, p. 181-186, 2001.

DURÃES, F.O.M. Sorgo sacarino: desenvolvimento de tecnologia agronômica. **Agroenergia em Revista**, v.3, p.7, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, EMBRAPA. Milho e Sorgo- Sistemas de Produção, Produção de sorgo, 2009.

EL-GENDY, Mervat Morsy Abbas Ahmed et al. Phylogenetic Analysis and Biological Evaluation of Marine Endophytic Fungi Derived from Red Sea Sponge *Hyrtios erectus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, p. 1-23, 2018.

FERNANDES, F.E.P. et al. Ensilagem de sorgo forrageiro com adição de ureia em dois períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2111-2115, 2009.

FIERRO-CRUZ, Juan E.; JIMÉNEZ, Pedro; COY-BARRERA, Ericsson. Fungal endophytes isolated from *Protium heptaphyllum* and *Trattinnickia rhoifolia* as antagonists of *Fusarium oxysporum*. **Revista Argentina de Microbiología**, 2017.

FISHER, P.J.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, v.120, n.1, p.137-143, 1992a.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; SCOTT, H.M.L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, n.2, p.299-305, 1992b.

FLETCHER, L.R.; HARVEY, I.C. An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. **New Zealand veterinary journal**, v.29, n.10, p.185-186, 1981.

FONSECA-GARCÍA, C. et al. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity. **Frontiers in microbiology**, v.7, 2016.

GAMA, D.S. Fungos endofíticos em *Brachiaria* e *Cynodon*. 2014.

GARAMPALLI, Rajkumar H.; DEENE, Sunanda; REDDY, C. Narayana. Infectivity and efficacy of *Glomus aggregatum* and growth response of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. in flyash amended sterile soil. **Journal of environmental biology**, v. 26, n. 4, p. 705-708, 2005.

GARDES, Monique; BRUNS, Thomas D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.

GDANETZ, Kristi; TRAIL, Frances. The Wheat Microbiome Under Four Management Strategies, and Potential for Endophytes in Disease Protection. **Phytobiomes**, v. 1, n. 3, p. 158-168, 2017.

GHEEWALA, N. et al. A review on endophytic fungi from *Musa paradisiaca* as anti-diabetic agent. **Annals of Pharma Research**, v.4, n.01, p.205-208, 2016.

GHIMIRE, S.R. et al. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, v.47, n.1, p.19-27, 2011.

GÖTZ, M. et al. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS microbiology ecology**, v.58, n.3, p.404-413, 2006.

HAMAYUN, Muhammad et al. Gibberellins Producing Endophytic Fungus *Porostereum spadiceum* AGH786 Rescues Growth of Salt Affected Soybean. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

HARZALLAH, D. et al. Endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum* Desf.): evaluation of their antimicrobial activity, antioxidant activity and host growth promotion. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v.77, n.3, p.245-248, 2011.

HELANDER, Marjo et al. Fragmented environment affects birch leaf endophytes. **New Phytologist**, v. 175, n. 3, p. 547-553, 2007.

HELANDER, M. et al. Endophytic fungi and silica content of different bamboo species in giant panda diet. **Symbiosis**, v.61, n.1, p.13-22, 2013.

- HERRERA, J. et al. Shifting fungal endophyte communities colonize *Bouteloua gracilis*: effect of host tissue and geographical distribution. **Mycologia**, v.102, n.5, p.1012-1026, 2010.
- HIGGINS, K. Lindsay et al. Culturing and direct PCR suggest prevalent host generalism among diverse fungal endophytes of tropical forest grasses. **Mycologia**, v.103, n.2, p.247-260, 2011.
- HIGGINS, K.L. et al. Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host-and habitat generalists characterized by strong spatial structure. **Fungal Ecology**, v.8, p.1-11, 2014.
- HIRUMA, Kei et al. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. **Cell**, v. 165, n. 2, p. 464-474, 2016.
- HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Divers**, v. 33, n. 163, p. e173, 2008.
- HOFFMAN, M.T. et al. Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. **PLoS One**, v.8, n.9, p.e73132, 2013.
- HOUSE, L.R., 1978. Aguide to *Sorghum* breeding. International Crop Research Institute for Semi Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, A.P., India.
- HUANG, W.Y. et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal diversity**, 2008.
- HUBBARD, M.; GERMIDA, J.J.; VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. **Journal of applied microbiology**, v.116, n.1, p.109-122, 2014.
- HUSBAND, R. et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. **Molecular Ecology**, v.11, n.12, p.2669-2678, 2002.
- HSIEH, T. C.; MA, K. H.; CHAO, Anne. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). **Methods in Ecology and Evolution**, v. 7, n. 12, p. 1451-1456, 2016.
- IANNONE, L.J. et al. Endophytes of native grasses from South America: biodiversity and ecology. **Fungal Ecology**, v.5, n.3, p.357-363, 2012.
- JIN, H. et al. Phylogenic diversity and tissue specificity of fungal endophytes associated with the pharmaceutical plant, *Stellera chamaejasme* L. revealed by a cultivation-independent approach. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.108, n.4, p.835-850, 2015.
- KAUL, S. et al. Prospecting endophytic fungal assemblage of *Digitalis lanata* Ehrh.(foxglove) as a novel source of digoxin: a cardiac glycoside. **3 Biotech**, v.3, n.4, p.335-340, 2013.

KEMLER, M. et al. Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **PLoS One**, v.8, n.12, p.e81718, 2013.

KHAN, Sumera Afzal et al. A new strain of *Arthrinium phaeospermum* isolated from *Carex kobomugi* Ohwi is capable of gibberellin production. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 2, p. 283-287, 2009.

KHIDIR, H.H. et al. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. **Journal of Arid Environments**, v.74, n.1, p.35-42, 2010.

KHIRALLA, A. et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v.8, n.9, p.701-704, 2015.

KLECZEWSKI, N. M. et al. A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. **Fungal ecology**, v. 5, n. 5, p. 521-529, 2012.

KO, Thida Win Ko et al. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes?. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 113, 2011.

KÖLJALG, Urmas et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular ecology**, v. 22, n. 21, p. 5271-5277, 2013.

KOZYROVSKA, N. et al. Novel inoculants for an environmentally-friendly crop production. **Resources, conservation and recycling**, v.18, n.1, p.79-85, 1996.

LARRAN, S. et al. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. **Biological Control**, v.92, p.17-23, 2016.

LARRAN, S. et al. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n.4, p.565-572, 2007.

LI, J. et al. Virgatolides A–C, benzannulated spiroketals from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis virgata*. **Organic letters**, v.13, n.10, p.2670-2673, 2011.

LI, G. et al. Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 Produces a Potent Antibacterial Tetracyclic Triterpenoid. **Journal of natural products**, v.78, n 8, p.2128-2132, 2015.

LIETH, H. Purposes of a phenology book. In: Phenology and seasonality modeling. **Springer Berlin Heidelberg**, p.3-19, 1974.

LIKAR, M. et al. Mycorrhizal status and diversity of fungal endophytes in roots of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and tartary buckwheat (*F. tataricum*). **Mycorrhiza**, v.18, n.6-7, p.309-315, 2008.

LIM, Chaesung et al. Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 20, n. 3, p. 494-500, 2010.

- LUO, Jing; WALSH, Emily; ZHANG, Ning. Four new species in Magnaporthaceae from grass roots in New Jersey Pine Barrens. **Mycologia**, v. 106, n. 3, p. 580-588, 2014.
- LUO, Jing et al. Five new Pseudophialophora species from grass roots in the oligotrophic pine barrens ecosystem. **Fungal biology**, v. 119, n. 12, p. 1205-1215, 2015.
- LORO M. et al. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. **Journal of Arid Environments**, v.85, p.46-55, 2012.
- LUCERO, M.E. et al. Endophyte microbiome diversity in micropropagated *Atriplex canescens* and *Atriplex torreyi* var *griffithsii*. **PLoS One**, v.6, n.3, p.e17693, 2011.
- MAKI, C.S. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). **Tese de Doutorado. Unidade Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas. Luiz de Qeiros**, 2006.
- MÁRQUEZ, S. S.; BILLS, G.F.; ZABALGOGEAZCOA, I. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. **Fungal Diversity**, v.27, p.171-195, 2007.
- MÁRQUEZ, S. S.; BILLS, G. F.; ZABALGOGEAZCOA, I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. **ATLANTIC**, v. 3, p. 1, 2008.
- MÁRQUEZ, S.S. et al. Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. **Fungal Diversity**, v.41, n.1, p.115-123, 2010.
- MÁRQUEZ, S.S. et al. Non-systemic fungal endophytes of grasses. **Fungal Ecology**, v.5, n.3, p.289-297, 2012.
- MARSHALL, D.; TUNALI, B.; NELSON, L. R. Occurrence of Fungal Endophytes in Species of Wild. **Crop Science**, v.39, n.5, p.1507-1512, 1999.
- MARTIN, R.C.; DOMBROWSKI, J.E. Isolation and Identification of Fungal Endophytes from Grasses along the Oregon Coast. **American Journal of Plant Sciences**, v.6, n.19, p.3216, 2015.
- MASSIMO, Nicholas C. et al. Fungal endophytes in aboveground tissues of desert plants: infrequent in culture, but highly diverse and distinctive symbionts. **Microbial ecology**, v. 70, n. 1, p. 61-76, 2015.
- MEKBIB, F. Infra-specific folk taxonomy in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in Ethiopia: folk nomenclature, classification, and criteria. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v.3, n.1, p.1, 2007.
- MENDES, B.V. Alternativas tecnológicas para a agricultura do semi-árido. **São Paulo: Nobel**, 1986.
- MENDIBURU F. 2016. Package agricolae: Statistic procedure for agricultural research. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

MILNE et al. TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics*, v. 20, n. 11, p. 1806-1807, 2004.

MISHRA, P.D. et al. Anti-inflammatory and anti-diabetic naphtha-quinones from an endophytic fungus *Dendryphion nanum* (Nees) S. Hughes. **Indian Journal of Chemistry**, v.52, p.565-567, 2013.

MOLINA, L.R. et al. Avaliação agronômica de seis híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Arq. bras. med. vet. zootec**, v.52, n.4, p.385-90, 2000.

MONTEIRO, M.C.D. et al. Obtenção e seleção de híbridos interespecíficos de sorgo forrageiro para Pernambuco e áreas similares. **Revista Ciência Agronômica**, v.35, p.238-247, 2004.

MORAKOTKARN, D.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. **FEMS microbiology letters**, v.266, n.1, p.10-19, 2007.

MOUHAMADOU, B. et al. Differences in fungal communities associated to *Festuca paniculata* roots in subalpine grasslands. **Fungal Diversity**, v.47, n.1, p.55-63, 2011.

MURPHY, B.R.; DOOHAN, F.M.; HODKINSON, T.R. Persistent fungal root endophytes isolated from a wild barley species suppress seed-borne infections in a barley cultivar. **Biocontrol**, v.60, n.2, p.281-292, 2015.

NAIK, B.S.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y.L. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. **Microbiological research**, v.164, n.3, p.290-296, 2009.

NEUMANN, M.; RESTLE, J.; BRONDANI, I.L. Avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) ou milho (*Zea mays*, L.) na produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.03, p.438-452, 2004.

NEWCOMBE, George et al. Endophytes influence protection and growth of an invasive plant. **Communicative & integrative biology**, v. 2, n. 1, p. 29-31, 2009.

OLIVETTI, M.P.A.; CAMARGO, A.M.M.P. Aspectos econômicos e desenvolvimento da cultura de sorgo. **Informações econômicas**, v.7, n.1, 1997.

OKSANEN J, et al. 2015. vegan: community ecology package. R package v.2.2-1. [WWW document] URL <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

OONO, R. et al. A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). **Fungal Biology**, v.119, n.10, p.917-928, 2015.

OULHEN, N.; SCHULZ, B.J.; CARRIER, T.J. English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech, 'Die Erscheinung der Symbiose' ('De la symbiose'). **Symbiosis**, v.69, n.3, p.131-139, 2016.

PAN, J.J.; BAUMGARTEN, A.M.; MAY, G. Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). **New Phytologist**, v.178, n.1, p.147-156, 2008.

PELÁEZ, F. et al. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, v.102, n.06, p.755-761, 1998.

PEREIRA J.O. 1993. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish***. Tese de Doutorado, Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. São Paulo.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial ecology of leaves. **Springer**, p.179-197, 1991.

PHILLIPS, Michael. **Mycorrhizal Planet: How Symbiotic Fungi Work with Roots to Support Plant Health and Build Soil Fertility**. Chelsea Green Publishing, 2017.

PHARAMAT, Thirawatthana et al. Antimicrobial and anticancer activities of endophytic fungi from *Mitrajyna javanica* Koord and Val. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 49, p. 5565-5572, 2013.

POPESCU, A. et al. Some considerations on the prospects of sorghum crop. **Scientific Papers**, p.295, 2014.

PORRAS-ALFARO et al. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.9, p.2805-2813, 2008.

RAI, M. et al. Fungal growth promotor endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. **Symbiosis**, v.62, n.2, p.63-79, 2014.

RAI, M. et al. Review: Mycoendophytes in medicinal plants: diversity and bioactivities. **Nusantara Bioscience**, v.4, n.2, p.86-96, 2012.

RAJA, Huzefa A. et al. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

REDECKER, D. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.244, n.1-2, p.67-73, 2002.

REHMAN, S. Endophytes: The Producers of Important Functional Metabolites. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v.5, n.5, p.377-391, 2016.

RIBAS, M.N. Avaliação agronômica e nutricional de híbridos de sorgo com capim sudão, normais e mutantes bmr - portadores de nervura marrom. **Tese (Doutorado em zootecnia). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte**, p.140, 2010.

RIBAS, P.M . Cultivo de sorgo: Importância econômica. **Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção**, 2ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 3^a edição Set./2007. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_3_ed/importancia .htm. Acesso em: 10 de jan. de 2013.

- RIBEIRO, K.G. et al. Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos “dark septate” a partir de plantas de arroz. **Revista Agro@mbiente On-line**, v.5, n.2, p.97-105, 2011.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu* and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.905-909, 1996.
- RODRIGUES, P.H.M. et al. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre a composição bromatológica e perfil fermentativo da silagem de sorgo produzida em silos experimentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2373-2379, 2002.
- RODRIGUEZ, R.J. et al. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **The ISME journal**, v.2, n.4, p.404-416, 2008.
- ROSA, L.H. et al. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biology**, v.32, n.2, p.161-167, 2009.
- RUSSO, M.L. et al. 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 Microbiologia**, v.48, n.2, p.154-160, 2016.
- SAIKKONEN, K. et al. Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. **Ecography**, v.23, n.3, p.360-366, 2000.
- SANTOS, M.S.; TABOSA, J.N.; DIAS, F.M.; FREITAS, E.V.; LIRA, M.A. Comportamento de clones de capim elefante x milheto no semi-árido do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.1609 – 1615, 1994.
- SANTOS, F.G. et al., Melhoramento de sorgo. In: BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. 2 ed. Viçosa, MG: **Editora UFV**, p.669-691, 2005
- SELIM, K. A. et al. Biodiversity and antimicrobial activity of endophytes associated with Egyptian medicinal plants. **Mycosphere**, v. 2, n. 6, p. 669-678, 2011.
- SCHULTHESS, F.M.; FAETH, S.H. Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). **Mycologia**, p.569-578, 1998.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, n.06, p.661-686, 2005.
- SCHÜBLER, Arthur; SCHWARZOTT, Daniel; WALKER, Christopher. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution** Dedicated to Manfred Kluge (Technische Universität Darmstadt) on the occasion of his retirement. **Mycological research**, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SHANKAR, N.B.; SHASHIKALA, J. Diversity and structure of fungal endophytes in some climbers and grass species of Malnad region, Western Ghats, Southern India. **Mycosphere**, v.1, n.4, p.265-274, 2010.

SHEN, X.-Y. et al. Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi isolated from moso bamboo seeds. **PloS one**, v.9, n.4, p.e95838, 2014.

SIEBER, T. et al. Endophytic Fungi in Four Winter Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.) Differing in Resistance Against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ.= *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. **Journal of Phytopathology**, v.122, n.4, p.289-306, 1988.

SILVA, Raimunda Nonata Oliveira et al. Comportamento agrônômico de cultivares de sorgo granífero avaliados em safrinha. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 3, 2011.

SOUZA, C.C. et al. Produtividade do *Sorgo granífero* cv. sacarino e qualidade de produtos formulados isoladamente ou combinados ao caldo de cana-de-açúcar. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.25, n.3, p.287-293, 2005.

SOUZA, Jorge T.; TROCOLI, Rafael O.; MONTEIRO, Fernando P. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. **Biological Control**, v. 94, p. 25-32, 2016.

SPYREAS, G.; GIBSON, D.J.; MIDDLETON, B.A. Effects of endophyte infection in tall fescue (*Festuca arundinacea*: Poaceae) on community diversity. **International Journal of Plant Sciences**, v.162, n.6, p.1237-1245, 2001.

STROBEL, G. et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v.60, n.2, p.179-183, 2002.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, n.6, p.535-544, 2003.

STROBEL, G.A. et al. *Pestalotiopsis quepinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. **Australian Journal of Botany**, v.45, n.6, p.1073-1082, 1997.

STROBEL, G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current opinion in microbiology**, v.9, n.3, p.240-244, 2006.

SU, Y.-Y.; GUO, L.-D.; HYDE, K.D. Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe, China. **Fungal Diversity**, v.43, n.1, p.93-101, 2010.

SUDHA, V. et al. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.59, p.e16150436, 2016.

SUN, X.; GUO, L.-D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, v.3, n.1, p.65-76, 2012.

- SZINK, I. et al. New evidence for broad trophic status of leaf endophytic fungi of *Quercus gambelii*. **Fungal Ecology**, v. 22, p. 2-9, 2016.
- TABOSA et al. Teste em linhas de sorgo no semi-árido de Pernambuco para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, n.12, p.1385-1390, 1993.
- TABOSA et al. Comportamento de cultivares de sorgo forrageiro em diferentes ambientes agroecológicos dos estados de Pernambuco e Alagoas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.02, p.47-58, 2002.
- TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v.18, n.4, p.448-459, 2001.
- TEJESVI, M.V. et al. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. **Fungal Diversity**, v.47, n.1, p.97-107, 2011.
- THOMAS, S.E. et al. Molecular characterisation of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. **Mycological Research**, v.112, n.7, p.852-860, 2008.
- TAMURA, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24, 1596–1599. 2007.
- TIAN, X.L. et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.3, p.303-309, 2004.
- U'REN, J.M. et al. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. **American Journal of Botany**, v.99, n.5, p.898-914, 2012.
- VALLINO, M. et al. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. **Environmental Microbiology**, v.8, n.6, p.971-983, 2006.
- VARVAS, V.; KULLMAN, B. First records of two ascomycetes on *Phleum pratense* in Estonia. **Folia Crypt. Est**, v.49, p.73-76, 2012.
- VARVAS, T.; KASEKAMP, K.; KULLMAN, B. Preliminary study of endophytic fungi in timothy (*Phleum pratense*) in Estonia. **Acta Mycologica**, v.48, n.1, 2013.
- VEGA, F.E. et al. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, v.3, n.3, p.122-138, 2010.
- VIDAL, S.; JABER, L.R. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. **Curr Sci**, v.109, p.46-54, 2015.
- VIEIRA, F.A. et al. Qualidade de silagens de sorgo com aditivos. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v.56, n.6, p.764-772, 2004.

VUJANOVIC, V.; MAVRAGANI, D.; HAMEL, C. Fungal communities associated with durum wheat production system: a characterization by growth stage, plant organ and preceding crop. **Crop Protection**, v.37, p.26-34, 2012.

WALLER, Frank et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 38, p. 13386-13391, 2005.

WAGENAAR, M.M. et al. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochrysiella*. **Journal of natural products**, v.63, n.12, p.1692-1695, 2000.

WANG, Q.; GUO, L.-D. Ectomycorrhizal community composition of *Pinus tabulaeformis* assessed by ITS-RFLP and ITS sequences. **Botany**, v.88, n.6, p.590-595, 2010.

WANG, Y. et al. Phylogenetic diversity of culturable endophytic fungi in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff), detection of polyketide synthase gene and their antagonistic activity analysis. **Fungal biology**, v.119, n.11, p.1032-1045, 2015.

WEŻOWICZ, Katarzyna; ROZPADEK, Piotr; TURNAU, Katarzyna. Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. **Mycorrhiza**, p. 1-13, 2017.

WHITE et al. Amplification and direct sequencing of fungal rRNA genes for phylogenetics, p 315–322. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, Inc, New York, NY, 1990.

WHITE, I.R.; BACKHOUSE, D. Comparison of fungal endophyte communities in the invasive panicoid grass *Hyparrhenia hirta* and the native grass *Bothriochloa macra*. **Australian journal of botany**, v.55, n.2, p.178-185, 2007.

WIRSEL, S.G.R. et al. Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. **New Phytologist**, v.149, n.3, p.589-598, 2001.

WU, Lingshang et al. Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. **Current microbiology**, v. 66, n. 1, p. 40-48, 2013.

YAHN, Rebecca; SCHOCH, Conrad L.; DENTINGER, Bryn TM. Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 371, n. 1702, p. 20150336, 2016.

YUAN, Z.-L. et al. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. **Applied and environmental microbiology**, v.76, n.5, p.1642-1652, 2010.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. **Fungal ecology**, v. 5, n. 1, p. 24-35, 2012.

ZHANG, B. et al. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science**, v.284, n.5416, p.974-977, 1999.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural product reports**, v.23, n.5, p.753-771, 2006.

ZHANG, T.; YAO, Y.-F. Endophytic fungal communities associated with vascular plants in the high arctic zone are highly diverse and host-plant specific. **PloS one**, v.10, n.6, p.e0130051, 2015.

ZHANG, Huiru; SUN, Xinchun; XU, Chunping. Antimicrobial activity of endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from medicinal honeysuckle plant. **Archives of Biological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 25-30, 2016.

ZHENG, You-Kun et al. Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng*: diversity and potential as biological control agents against host plant pathogens of root-rot disease. **Journal of ginseng research**, v. 41, n. 3, p. 353-360, 2017.

ZHU, M.-J. et al. Diversity and taxonomy of endophytes from *Leymus chinensis* in the Inner Mongolia steppe of China. **FEMS microbiology letters**, v.340, n.2, p.135-145, 2013.

ZIMMERMAN, N.B.; VITOUSEK, P.M. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.32, p.13022-13027, 2012.

APÊNDICE A – *Pseudophialophora sorghi* R.J.V. OLIVEIRA, C.M. GONÇ., G.A. SILVA & J.L. BEZERRA, SP. NOV. (Persoonia 39: 330-331)



Fungal Planet description sheets: 625–715

P.W. Crous^{1,2}, M.J. Wingfield³, T.I. Burgess⁴, A.J. Carnegie⁵, G.E. St. J. Hardy⁴, D. Smith⁶, B.A. Summerell⁷, J.F. Cano-Lira⁸, J. Guarro⁸, J. Houbraken¹, L. Lombard¹, M.P. Martín⁹, M. Sandoval-Denis^{1,69}, A.V. Alexandrova¹⁰, C.W. Barnes¹¹, I.G. Baseia¹², J.D.P. Bezerra¹³, V. Guarnaccia¹, T.W. May¹⁴, M. Hernández-Restrepo¹, A.M. Stchigel⁸, A.N. Miller¹⁵, M.E. Ordoñez¹⁶, V.P. Abreu¹⁷, T. Accioly¹⁸, C. Agnello¹⁹, A. Agustin Colmán¹⁷, C.C. Albuquerque²⁰, D.S. Alfredo¹⁸, P. Alvarado²¹, G.R. Araújo-Magalhães²², S. Arauzo²³, T. Atkinson²⁴, A. Barili¹⁶, R.W. Barreto¹⁷, J.L. Bezerra²⁵, T.S. Cabral²⁶, F. Camello Rodríguez²⁷, R.H.S.F. Cruz¹⁸, P.P. Daniëls²⁸, B.D.B. da Silva²⁹, D.A.C. de Almeida³⁰, A.A. de Carvalho Júnior³¹, C.A. Decock³², L. Delgat³³, S. Denman³⁴, R.A. Dimitrov³⁵, J. Edwards³⁶, A.G. Fedosova³⁷, R.J. Ferreira³⁸, A.L. Firmino³⁹, J.A. Flores¹⁶, D. García⁸, J. Gené⁸, A. Giraldo¹, J.S. Góis⁴⁰, A.A.M. Gomes¹⁷, C.M. Gonçalves¹³, D.E. Gouliamova⁴¹, M. Groenewald¹, B.V. Guéorguiev⁴², M. Guevara-Suarez⁸, L.F.P. Gusmão³⁰, K. Hosaka⁴³, V. Hubka⁴⁴, S.M. Huhndorf⁴⁵, M. Jadan⁴⁶, Ž. Jurjević⁴⁷, B. Kraak¹, V. Kučera⁴⁸, T.K.A. Kumar⁴⁹, I. Kušan⁴⁶, S.R. Lacerda⁵⁰, S. Lamlerthron⁵¹, W.S. Lisboa¹⁷, M. Loizides⁵², J.J. Luangsa-ard⁵³, P. Lysková⁵⁴, W.P. Mac Cormack⁵⁵, D.M. Macedo⁵⁶, A.R. Machado¹³, E.F. Malysheva³⁷, P. Marinho⁵⁷, N. Matočec⁴⁶, M. Meijer¹, A. Mešić⁴⁶, S. Mongkolsamrit⁵³, K.A. Moreira⁶⁰, O.V. Morozova³⁷, K.U. Nair⁵⁸, N. Nakamura⁵⁹, W. Noisripoom⁵³, I. Olariaga⁶⁰, R.J.V. Oliveira¹³, L.M. Paiva¹³, P. Pawar⁵⁸, O.L. Pereira¹⁷, S.W. Peterson⁶¹, M. Prieto⁶², E. Rodríguez-Andrade⁸, C. Rojo De Blas⁶³, M. Roy⁶⁴, E.S. Santos⁶⁵, R. Sharma⁵⁸, G.A. Silva¹³, C.M. Souza-Motta¹³, Y. Takeuchi-Kaneko⁵⁹, C. Tanaka⁵⁹, A. Thakur⁵⁸, M.Th. Smith¹, Z. Tkalčec⁴⁶, N. Valenzuela-Lopez^{8,66}, P. van der Kleij⁶⁷, A. Verbeken³³, M.G. Viana⁶⁵, X.W. Wang⁶⁸, J.Z. Groenewald¹

Key words

ITS nrDNA barcodes
 LSU
 novel fungal species
 systematics

Abstract Novel species of fungi described in this study include those from various countries as follows: **Antarctica:** *Cadophora antarctica* from soil. **Australia:** *Alfaria dandenongensis* on *Cyperaceae*, *Amphosoma persooniae* on *Persoonia* sp., *Anungitea nullicana* on *Eucalyptus* sp., *Bagadiella eucalypti* on *Eucalyptus globulus*, *Castanediella eucalyptigena* on *Eucalyptus* sp., *Cercospora dianellicola* on *Dianella* sp., *Cladiorhiza kinglakeensis* on *Eucalyptus regnans*, *Cladiorhiza xanthorrhoeae* (incl. *Cladiorhizaceae* fam. nov. and *Cladiorhizales* ord. nov.) on *Xanthorrhoea* sp., *Cochlearomyces eucalypti* (incl. *Cochlearomyces* gen. nov. and *Cochlearomycetaceae* fam. nov.) on *Eucalyptus obliqua*, *Codinaea lambertiae* on *Lambertia formosa*, *Diaporthe obtusifolia* on *Acacia obtusifolia*, *Didymella acaciae* on *Acacia melanoxylon*, *Dothidea eucalypti* on *Eucalyptus dalrympleana*, *Fitzroyomyces cyperi* (incl. *Fitzroyomyces* gen. nov.) on *Cyperaceae*, *Murramarangomyces corymbiae* (incl. *Murramarangomyces* gen. nov., *Murramarangomycetaceae* fam. nov. and *Murramarangomycetales* ord. nov.) on *Corymbia maculata*, *Neonungitea eucalypti* (incl. *Neonungitea* gen. nov.) on *Eucalyptus obliqua*, *Neoconiothyrium persooniae* (incl. *Neoconiothyrium* gen. nov.) on *Persoonia laurina* subsp. *laurina*, *Neocrinula lambertiae* (incl. *Neocrinulaceae* fam. nov.) on *Lambertia* sp., *Ochroconis podocarpi* on *Podocarpus grayae*, *Paraphysalospora eucalypti* (incl. *Paraphysalospora* gen. nov.) on *Eucalyptus sieberi*, *Pararamichloridium livistonae* (incl. *Pararamichloridium* gen. nov., *Pararamichloridiaceae* fam. nov. and *Pararamichloridiales* ord. nov.) on *Livistona* sp., *Pestalotiopsis dianellae* on *Dianella* sp., *Phaeosphaeria gahniae* on *Gahnia aspera*, *Phlogicylindrium tereticornis* on *Eucalyptus tereticornis*, *Pleopassalora acaciae* on *Acacia obliqua*, *Pseudodactylaria xanthorrhoeae* (incl. *Pseudodactylaria* gen. nov., *Pseudodactylariaceae* fam. nov. and *Pseudodactylariales* ord. nov.) on *Xanthorrhoea* sp., *Pseudosporidesmium lambertiae* (incl. *Pseudosporidesmiaceae* fam. nov.) on *Lambertia formosa*, *Saccharata acaciae* on *Acacia* sp., *Saccharata epacridis* on *Epacris* sp., *Saccharata hakeigena* on *Hakea sericea*, *Seiridium persooniae* on *Persoonia* sp., *Semifissispora tooloomensis* on *Eucalyptus dunii*, *Stagonospora lomandrae* on *Lomandra longifolia*, *Stagonospora victoriana* on *Poaceae*, *Subramaniomyces podocarpi* on *Podocarpus elatus*, *Symptenturia melaleuca* on *Melaleuca* sp., *Symptenturia regnans* on *Eucalyptus regnans*, *Trichomerium eucalypti* on *Eucalyptus tereticornis*, *Vermiculariopsisella eucalypticola* on *Eucalyptus dalrympleana*, *Verrucoconiothyrium acaciae* on *Acacia falciformis*, *Xenopassalora petrophiles* (incl. *Xenopassalora* gen. nov.) on *Petrophile* sp., *Zasmidium dasygogonis* on *Dasygogon* sp., *Zasmidium gahnicola* on *Gahnia sieberiana*. **Brazil:** *Achaetomium lippiae* on *Lippia gracilis*, *Cyathus isometricus* on decaying wood, *Geastrum cariense* on soil, *Lycoperdon demoulinii* (incl. *Lycoperdon* subg. *Arenicola*) on soil, *Megatomentella cristata* (incl. *Megatomentella* gen. nov.) on unidentified plant, *Mutinus verrucosus* on soil, *Paraopeba schefflerae* (incl. *Paraopeba* gen. nov.) on *Schefflera morototoni*, *Phyllosticta catimbauensis* on *Mandevilla catimbauensis*, *Pseudocercospora angularis* on *Prunus persica*, *Pseudophialophora sorghi* on *Sorghum bicolor*, *Spumula piptadeniae* on *Piptadenia paniculata*. **Bulgaria:** *Yarrowia parophonii* from gut of *Parophonus hirsutulus*. **Croatia:** *Pyrenopeziza velebitica* on *Lonicera borbasiana*. **Cyprus:** *Peziza halophila* on coastal dunes.

© 2017 Naturalis Biodiversity Center & Westerdijk Fungal Biodiversity Institute

You are free to share - to copy, distribute and transmit the work, under the following conditions:

Attribution: You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work).

Non-commercial: You may not use this work for commercial purposes.

No derivative works: You may not alter, transform, or build upon this work.

For any reuse or distribution, you must make clear to others the license terms of this work, which can be found at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/legalcode>. Any of the above conditions can be waived if you get permission from the copyright holder. Nothing in this license impairs or restricts the author's moral rights.

Pseudophialophora sorghi

Fungal Planet 649 – 20 December 2017

***Pseudophialophora sorghi* R.J.V. Oliveira, C.M. Gonçalves, G.A. Silva & J.L. Bezerra, sp. nov.**

Etymology. Name refers to the host plant, *Sorghum bicolor*, from which this fungus was isolated as endophyte.

Classification — Magnaporthaceae, Magnaporthales, Sordariomycetes.

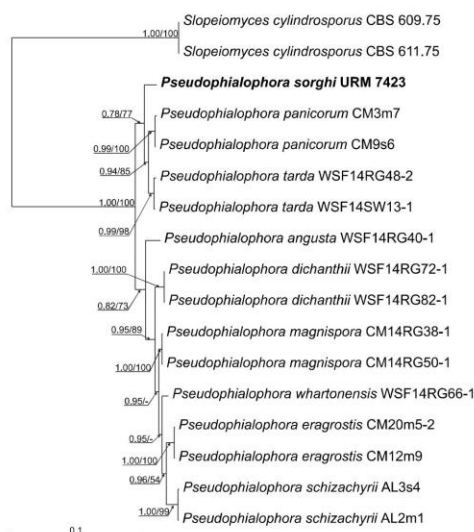
Hyphae hyaline, septate, branched, sometimes forming sterile coils. **Conidiophores** micronematous, simple or branched, hyaline, septate, non-constricted, cylindrical, straight to flexuous, apex attenuated, base not inflated. **Conidiogenous cells** polyphialidic, hyaline, simple or branched, attenuated, 4–22 × 3.5 µm. **Chlamydospores** intercalary, globose to subglobose. **Anastomosis** sometimes observed between conidiogenous cells and between conidia. **Conidia** aggregated in slimy heads, oblong ellipsoidal to ellipsoidal, aseptate, hyaline, smooth, 5–8.5 × 2–3 µm.

Culture characteristics — Colonies on PDA growing up to 1.2 cm diam after 7 d in the dark at 25 °C, dark grey, surface pale grey, aerial mycelia whitish to pale grey, reverse dark grey.

Typus. BRAZIL, Pernambuco, Serra Talhada (S07°59'00" W38°19'16"), as endophyte in roots of *Sorghum bicolor* (Poaceae), Dec. 2014, R.J.V. Oliveira (holotype as metabolically inactive culture, URM 7423, ITS, LSU, *rpb1* and *tef1* sequences GenBank KY421938, KY421941, KY421944 and KY421942, MycoBank MB819580).

Notes — The phylogenetic analyses of the four-gene dataset (*tef1*, *rpb1*, ITS and LSU rDNA) showed that *Pseudophialophora sorghi* formed a distinct clade with other species of *Pseudophialophora* with high support values. On ITS *P. sorghi* is 96 % (456/474) similar to *P. panicorum* (strain CM3m7, GenBank KF689652) and 96 % (443/463) to *P. tarda* (strain WSF14RG48-2, GenBank KP769840). The LSU sequence is 99 % (564/568) similar to *P. panicorum* (strain CM3m7, GenBank KF689642) and 99 % (566/568) to *P. tarda* (strain WSF14RG48-2, GenBank KP769832). The *rpb1* sequence is 99 % (602/608) similar to *P. panicorum* (strain CM9s6, GenBank KF689621) and 99 % (603/608) to *P. tarda* (strain WSF14RG48-2, GenBank KP784823). The *tef1* sequence is 99 % (884/893) similar to *P. panicorum* (strain CM3m7, GenBank KF689632) and 99 % (883/893) to *P. tarda* (strain WSF14SW13-1, GenBank KP784830). In the phylogenetic analysis *P. sorghi* is nearest to *P. panicorum* and *P. tarda*. However, colonies of *P. sorghi* are dark grey while *P. tarda* presents colonies yellowish and *P. panicorum* presents colonies yellow-green. Furthermore, conidia of *P. sorghi* (5–8.5 × 2–3 µm) are slightly smaller than conidia of *P. tarda* (7.5–9.5 × 2.5–3.5 µm) and conidia of *P. panicorum* (7.5–11.5 × 3.5–5 µm) (Luo et al. 2014, 2015). Anastomosis between conidiogenous cells and between conidia of *P. sorghi* were sometimes observed. This has never been reported in any species of *Pseudophialophora*.

Colour illustrations. *Sorghum bicolor* in the Instituto Agronômico de Pernambuco, Serra Talhada, Brazil; conidiophores; conidia, chlamydospores, sterile coils, anastomosis between conidiogenous cells, conidia and between hyphae. Scale bars = 20 µm.



Phylogenetic tree of the *Pseudophialophora* constructed using concatenated *tef1*, *rpb1*, ITS and LSU sequences. *Slopeiomyces cylindrosporus* (CBS 609.75 and CBS 611.75) was used as outgroup. Support values are from Bayesian inference and Maximum Likelihood (ML) analyses, respectively. The new species is in bold face. Support values of at least 50 % are shown at nodes.

Rafael J.V. Oliveira, Camila M. Gonçalves & Gladstone A. Silva, Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; e-mail: rafaelvilela87@gmail.com, mila24melo@gmail.com & gladstonesilva@yahoo.com
José L. Bezerra, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, 44.380-000, Centro, Cruz das Almas, Bahia, Brazil; e-mail: jlulabezerra@hotmail.com