



TALITA COELI D'ANGELIS DE APARECIDA RAMOS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA PARA
PROSPECÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS DO QUADRILÁTERO
FERRÍFERO – MG**

**SETE LAGOAS / MG
2016**

TALITA COELI D'ANGELIS DE APARECIDA RAMOS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA PARA
PROSPECÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS DO QUADRILÁTERO
FERRÍFERO – MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus Sete Lagoas* - MG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Coorientador: Dr. Francisco Adriano de Souza

SETE LAGOAS / MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Divisão de Biblioteca da UFSJ - MG - Brasil.

R175d
2016 Ramos, Talita Coeli D'Angelis de Aparecida, 1985 -
Identificação e caracterização genética para prospecção do
potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do
Quadrilátero Ferrífero, MG / Talita Coeli D'Angelis de Aparecida
Ramos. -- 2016.
94 p. : il.

Orientador: Ivanildo Evódio Marriel.
Coorientador: Francisco Adriano de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São João Del-Rei,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

1. Solos - Fungos filamentosos - Teses. 2. Solos - Fungos - Quadrilátero
ferrífero, MG - Teses. 3. Solos - Fungos - Biotecnologia - Teses I. Ramos,
Talita Coeli D'Angelis de Aparecida. II. Marriel, Ivanildo Evódio. III.
Souza, Francisco Adriano de. IV. Universidade Federal de São João Del-Rei.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. V. Título.

TALITA COELI D'ANGELIS DE APARECIDA RAMOS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA PARA
PROSPECÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS DO QUADRILÁTERO
FERRÍFERO – MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Coorientador: Dr. Francisco Adriano de Souza

Sete Lagoas, 26 de fevereiro de 2016.

Banca Examinadora:

Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva - Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Frederick Mendes Aguiar - Embrapa Milho e Sorgo

Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel- Embrapa Milho e Sorgo
(Orientador)

EPÍGRAFE

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Afonso e Dos Anjos e à minha filha Ana Clara, os amores da minha vida,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, criador perfeito, responsável por tudo.

Ao PPGCA- Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, pela oportunidade concedida para realização do mestrado e pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela estrutura para a realização do trabalho.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro e a Empresa Vale pelo apoio logístico durante as coletas.

Ao Dr. Ivanildo, pela especial orientação e disponibilidade em ensinar, pelo carinho, paciência e por todo incentivo.

Ao meu co-orientador Dr. Francisco, pela imensa colaboração, acompanhamento e incentivo no desenvolvimento da pesquisa. Pelos valiosos ensinamentos e confiança.

À Dra. Christiane e ao Dr. Frederick por terem aceitado participar da banca examinadora.

À equipe do laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, pela companhia, momentos de descontração e troca de experiências, em especial à Karyne, por todo auxílio em várias etapas do trabalho.

À equipe do Núcleo de Biologia Aplicada pelo suporte nas análises moleculares em especial à Beatriz, Marcos e Ana Laura.

Ao Maycon, pela gentileza e prontidão no fornecimento das culturas sempre que necessário.

Aos meus queridos amigos e irmãos acadêmicos Denise, Izabele, João e Matilde pela amizade e apoio.

À Elaine e ao Prof. José Edson, pelos conselhos, conversas e conhecimento compartilhado.

Ao Gabriel, por todo empenho e dedicação com os experimentos de *Trichoderma*.

À Dra. Maria Lucia e Michele, pela disponibilidade e auxílio com o HPLC.

Ao Clóvis, pelo auxílio nas análises de Potássio.

Ao Sr. Henri Bergs da Fairport, pelo auxílio inestimável com o Bionumerics

Às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Afonso e Dos Anjos; meus irmãos Michelle e André; meu companheiro Juliano e ao meu pingo de ouro Ana Clara, por todo amor, paciência e apoio.

À todos que estiveram presentes em minha vida e contribuíram para elaboração deste trabalho em suas diferentes formas, sou muito grata.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. O solo como Habitat de Fungos.....	4
2.2. Importância Ecológica e Biotecnológica dos Fungos Filamentosos.....	5
2.2.1. Biossolubilização e produção de ácidos orgânicos.....	7
2.3. Biodiversidade de Fungos Filamentosos.....	10
2.4. Técnicas para Identificação e Avaliação da Diversidade de Fungos Filamentosos.....	12
2.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	14
2.4.2. Sequenciamento da região ITS.....	15
2.4.3. ISSR (“Inter simple sequence repeat”) e rep-PCR (“Repetitive Sequence Based – PCR”).....	16
2.5. Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais e o Centro de Biodiversidade da Vale S.A (Cebio).....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Caracterização dos Sítios de Coleta das Amostras e Reativação dos Isolados de Fungos Filamentosos Depositados na Coleção de Microorganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-EMS).....	19
3.2. Caracterização Molecular.....	20
3.2.1. Extração do DNA.....	21
3.2.2. Caracterização da diversidade genética por BOX-PCR e ISSR.....	22
3.2.3. Identificação dos isolados a partir da amplificação da região ITS do Rdna e sequenciamento.....	23
3.2.4. Análise filogenética.....	24
3.3. Avaliação da Capacidade de Biossolubilização de Potássio e Produção de Ácidos Orgânicos in vitro por Fungos Filamentosos.....	24
3.4. Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Caracterização da Diversidade Genética por BOX-PCR e ISSR.....	26
4.2. Caracterização Filogenética de Fungos Filamentosos por Sequenciamento da Região ITS do rDNA.....	35
4.3. Potencial Biotecnológico dos Fungos Filamentosos.....	49
4.4. Estimativa da Diversidade Genética de <i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> e <i>Penicillium</i> com marcador ISSR GTG.....	52

4.5. Avaliação da Capacidade de Biossolubilização de Potássio in vitro por Fungos Filamentosos.....	59
4.6. Produção de Ácidos Orgânicos in vitro por Fungos Filamentosos.....	62
5. CONCLUSÕES.....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
7. ANEXO(S).....	81

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA PARA PROSPECÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO – MG

RESUMO – Fungos filamentosos são importantes componentes da diversidade biológica, pois desempenham funções de destaque em seus habitats naturais além de representarem uma fonte diversa e valiosa de recursos genéticos para utilização em inúmeros processos e aplicações biotecnológicas. Entretanto, a diversidade de fungos em solos é pouco conhecida, principalmente em solos impactados por processos de mineração e entorno. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a diversidade genética e funcional de fungos filamentosos depositados na Coleção de Micro-organismos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-EMS) isolados de amostras de solo da região do Quadrilátero Ferrífero, MG, em áreas de Mata, Eucalipto, Cerrado, Canga e Capim. Após reativação e teste de pureza, 186 isolados foram caracterizados geneticamente através de marcadores moleculares BOX-PCR, ISSR (“Inter simple sequence repeat”) utilizando o iniciador GTG₅, e identificados filogeneticamente por sequenciamento da região Espaço Interno Transcrito (ITS) do rDNA. Baseado na diversidade genética, nove isolados foram pré-selecionados e avaliados quanto à capacidade de bio-solubilização de Potássio (K) e produção de ácidos orgânicos em meio de cultura líquido, contendo as rochas potássicas verdete e flogopito. Detectou-se alta variabilidade genética inter e intraespecífica entre os isolados com base na genotipagem por ISSR e BOX, no entanto, o ISSR apresentou maior eficiência de amplificação e melhor resolução nos padrões de “fingerprinting”. A identificação filogenética via sequenciamento revelou a ocorrência de 11 gêneros, com predominância de *Penicillium* e *Trichoderma* em todas as áreas de coleta, seguido de *Aspergillus* com exceção da área Cerrado. O iniciador GTG₍₅₎ foi eficiente em discriminar a diversidade inter e intra-específica entre os isolados dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. A eficiência solubilizadora de K variou em função do tipo de rocha e do isolado fúngico. O isolado denominado CMSV798 apresentou elevada taxa de produção dos ácidos láctico, cítrico e oxálico independentemente do tipo de rocha. Os resultados observados em relação à diversidade estrutural e funcional da comunidade de fungos filamentosos habitantes de ambientes ferruginosos demonstram o seu potencial de prospecção para processos biotecnológicos diversos de interesse agroindustrial e ambiental.

Palavras chave: Genotipagem; ISSR; fingerprinting; coleções ex-situ; bioprodutos; bio-solubilização

GENETIC IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM SOILS OF THE QUADRILÁTERO FERRÍFERO, MINAS GERAIS STATE, BRAZIL

ABSTRACT - Filamentous fungi are important components of the biological diversity playing prominent roles in natural habitats. Besides, they represent a diverse and valuable source of genetic resources for use in numerous biotechnological processes and applications. However, the diversity of fungi in soils is not fully known, particularly in soils affected by mining processes and their surroundings areas. The objective of this study was to identify and characterize the genetic and functional diversity of filamentous fungi deposited at the Collection of Microorganisms of Embrapa Maize and Sorghum (CMMF-EMS) isolated from soil samples from the Quadrilátero Ferrífero region, Minas Gerais, Brazil, taken from: Forest, Eucalyptus, Cerrado, Canga and grass fields. After reactivation and purity test, 186 isolates were genetically characterized by molecular markers - BOX-PCR and ISSR (Inter simple sequence repeat) using the GTG₅ primer and identified phylogenetically by sequencing the internal transcribed spacer region (ITS) of the rDNA. Based on the genetic diversity, nine isolates were selected and evaluated for their ability for bio-leaching of Potassium (K) and production of organic acids in liquid culture medium enriched with two types of potassic rock verdigris and flogopito. Among the tested isolates was detected high inter and intraspecific genetic variability based on genotyping with ISSR and BOX. However, the ISSR showed higher amplification efficiency and better resolution of fingerprinting patterns as compared with box. Phylogenetic identification via sequencing revealed the occurrence of 11 genera, with predominance of *Penicillium* and *Trichoderma* in all sites, followed by *Aspergillus* except for the Cerrado area. The primer GTG₅ was effective in discriminating inter and intraspecific diversity among isolates of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Trichoderma*. The K solubilization efficiency was dependent on the type of rock and the fungal isolate. Among the isolates tested the strain CMSV798 showed the higher production rate of lactic, citric and oxalic acid production regardless of rock type tested. The filamentous fungi inhabiting ferruginous environments demonstrate biotechnological potential for various agro-industrial and environmental processes.

Keywords: Genotyping; ISSR; fingerprinting; ex-situ germplasm collections; bioproducts; biosolubilization

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são cruciais para a função e manutenção da estabilidade do ecossistema terrestre e da biosfera. Sua importância está relacionada principalmente ao seu papel na ciclagem biogeoquímica de nutrientes, biocontrole em agroecossistemas, biorremediação, destoxificação de ambientes contaminados, entre outros (Singh, 2009).

Em função da degradação constante de ecossistemas naturais e alterações na população de organismos ainda não conhecidos, têm sido envidados esforços de pesquisa com ênfase na sua preservação, com interesse acadêmico e biotecnológico. Reconhece-se que o sucesso da biotecnologia em geral depende essencialmente de três pontos: (i) da diversidade conhecida de espécies/cepas de micro-organismos, (ii) da diversidade de moléculas produzidas como resultado de seus metabolismos primários e secundários, e (iii) da conservação desses recursos genéticos (Hunter-Cevera, 1998).

A importância de se estudar a diversidade microbiológica está relacionada (i) à expansão do conhecimento acerca das estratégias e limites de adaptação evolutiva, bem como da importância dos micro-organismos para a sustentabilidade da vida no planeta, (ii) ao uso dos padrões de diversificação dos mesmos para fins de monitoramento e previsão de alterações ambientais, (iii) ao entendimento de como os micro-organismos afetam a biologia dos organismos superiores, e (iv) ao desenvolvimento de comunidades microbianas como modelos para estudos de interações biológicas, evolutivas e ecológicas (Staley et al., 1997).

Não obstante essas considerações, pouco se conhece sobre a diversidade genética, filogenética e metabólica da comunidade microbiana nos ecossistemas tropicais (Singh, 2009). Neste contexto, as coleções *ex-situ* representam um microcosmo da diversidade global e têm sido utilizadas com sucesso na preservação da biodiversidade microbiana, com potencial de uso como fontes de micro-organismos *per se*, genes ou metabólitos importantes dentro do preceito de desenvolvimento sustentável, nas dimensões econômicas, social e ambiental.

Dentre os micro-organismos ecológica e agronomicamente importantes, destacam-se os fungos filamentosos. Os fungos são importantes componentes da biodiversidade e desempenham funções de destaque em seus habitats naturais além de representarem uma fonte diversa e valiosa de recursos genéticos para utilização em inúmeras aplicações biotecnológicas e processos como biorremediação, biodegradação, processos

agrícolas, desenvolvimento de estratégias de recuperação de ambientes degradados, bem como a probabilidade de descobrimento de novas espécies para a ciência e a prospecção e exploração dos mais variados bioprodutos, constituindo-se um patrimônio genético com alto valor econômico agregado (Adrio & Demain, 2003; Mello et al., 2011).

O avanço no conhecimento de micro-organismos implica em disponibilidade de métodos precisos que permitam a diferenciação, classificação e identificação de isolados de interesse. Basicamente, os métodos para estudos de micro-organismos incluem as técnicas convencionais (morfológica e bioquímica) e moleculares. Algumas espécies apresentam dificuldade de cultivo e alta variabilidade morfológica e bioquímica, desta forma, as técnicas moleculares têm possibilitado uma abordagem complementar e mais abrangente às metodologias de classificação tradicionais de forma a solucionar dúvidas taxonômicas, bem como estudar a variabilidade genética do acervo (Das et al., 2014).

A amplificação e sequenciamento da região do espaço interno transcrito (ITS) têm sido uma ferramenta útil na identificação de espécies de fungos (Porter & Golding, 2011). Esta identificação, ao nível de gênero ou espécie, é um bom indicativo do potencial biotecnológico de organismos, principalmente para aqueles pertencentes a grupos com potencial conhecido.

A caracterização genética (genotipagem) permite uma melhor caracterização da variabilidade intra-específica, ou seja, dentro de um mesmo nível hierárquico. Para tal, os marcadores moleculares ISSR (“Inter simple sequence repeat”) e o rep-PCR (“repetitive sequence based-PCR”) por meio do elemento BOX, são amplamente explorados em estudos de diversidade genética, relações filogenéticas, caracterização de fungos, taxonomia dentre outros (Zhou et al., 2001).

A combinação de várias técnicas de biologia molecular, aliada às técnicas de microbiologia tradicionais, torna-se importante para um melhor entendimento da diversidade microbiana, assim como permite ampliar o conhecimento do potencial biotecnológico de micro-organismos mantidos em coleções biológicas *ex situ*, além de fornecer informações importantes a respeito das estratégias de exploração e determinação do seu uso futuro, agregando valor aos isolados depositados na coleção (Mello et al., 2011).

Vale salientar que a bioprospecção de fungos adaptados a solos com predominância de determinados metais ou substâncias químicas, como os solos próximos às áreas de mineração, permitem o entendimento da composição dos principais

grupos dominantes nestes ambientes e a identificação de estirpes de metabolismo diferenciado com possibilidade de utilização em diferentes processos, como por exemplo, a biossolubilização de minerais de interesse agrícola, biorremediação de ambientes impactados, dentre outros. Entretanto, os conhecimentos disponíveis a respeito da estrutura e função de comunidades microbianas de ambientes minerados ainda são incipientes.

Como parte integrante de uma rede nacional de pesquisas sobre a prospecção de comunidades fungicas de áreas de mineração e de preservação como agentes de biorremediação e biotransformação, financiado pela FAPEMIG, FAPESP, FAPESPA e VALE S.A, projeto CRA-RDP 136-10, subprojeto 13, este trabalho teve como objetivos fundamentais a identificação e caracterização da diversidade genética e funcional de fungos filamentosos isolados de amostras de solo da região do Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Solo como Habitat de Fungos

O solo é um habitat de natureza dinâmica, heterogênea e complexa, considerado um dos ecossistemas terrestres que apresenta maior diversidade biológica (Nanipieri et al., 2003). Sua matriz é formada por partículas de argila, areia, silte e matéria orgânica que formam agregados de diferentes tamanhos, formatos e características químicas juntamente com os micro-organismos e os compostos orgânicos. Os espaços (poros) entre os agregados são variavelmente ocupados por água e uma mistura de gases, principalmente oxigênio, nitrogênio, gás carbônico e etileno (Neto et al., 2001). Estes espaços são ideais para o desenvolvimento dos micro-organismos, que utilizam as partículas orgânicas ou as raízes das plantas como substratos (Daniel, 2005).

Este ecossistema abriga representantes de todos os reinos e domínios, dentre eles uma vasta população de micro-organismos representados por cinco grandes grupos: Bactérias, Actinomicetos, Fungos, Algas e Protozoários. O solo é considerado um dos principais habitats para o desenvolvimento desses micro-organismos e, dentre a microbiota do solo, normalmente, os fungos são os mais abundantes em relação à biomassa e atividade fisiológica (Bills et al., 2004).

Os fungos são organismos eucarióticos heterotróficos pertencentes ao reino *Fungi*, um dos grupos mais diversos de organismos no planeta (Tedersoo et al., 2010). Podem ser unicelulares (leveduras) e/ou consistir em hifas (filamentosos) que se ramificam em várias direções coletivamente. Os fungos podem ser classificados a partir das características morfológicas das hifas (septadas e não septadas), corpos de frutificação, esporos e ciclo de vida (Moreira & Siqueira, 2006). Estes estão amplamente distribuídos em todos os ecossistemas terrestre, por causa da sua ampla adaptação ecológica que lhes confere capacidade de colonizar diferentes ambientes, inclusive os extremos (Onofri et al., 2011; Selbmann et al., 2013).

Os fungos, em especial os fungos filamentosos que compõem a microbiota do solo representam uma das linhagens evolutivas mais amplas e juntamente com uma complexa comunidade de micro e macro-organismos contribuem efetivamente para vários serviços indispensáveis ao funcionamento sustentável de todos os

ecossistemas (Muller et al., 2004). Nos solos, os fungos constituem-se um grupo de destaque na decomposição da matéria orgânica complexa, degradando a celulose e lignina, entre outros polímeros, na estabilidade de agregados e ciclagem de nutrientes (Dashtban et al., 2010).

A diversidade de fungos filamentosos neste habitat é afetada por numerosos fatores bióticos e abióticos o qual estão expostos, tais como sua natureza física, química e pelo tipo de vegetação predominante (Behera et al., 2014). Fatores como o tamanho das partículas e agregados do solo, composição e quantidade de matéria orgânica podem influenciar a ocorrência e a distribuição espacial dos fungos (Kang & Mills, 2006; Buée et al., 2009).

Alguns gêneros de fungos filamentosos são frequentemente encontrados na maioria dos tipos de solos. Entre os Ascomycetos, os principais gêneros encontrados são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicocum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Gliomastix*, *Memnoniela* e *Stachybotrys*. Dentre os Zigomicetos destacam-se os gêneros *Absidia*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Gymnoascus* (Maia et al., 2006). Entre os Basidiomicetos, há dois grupos conhecidos em geral como *Hymenomycetes* e *Gasteromycetes*. Estes, em geral, são macroscópicos e variam de cor, tamanho e forma (Alexopoulos et al., 1996).

2.2. Importância Ecológica e Biotecnológica dos Fungos Filamentosos

Os fungos têm importância primordial nos diversos ambientes, estando entre os principais responsáveis por uma série de processos importantes como a decomposição da matéria orgânica, estabilidade de agregados e ciclagem de nutrientes (Dashtban et al., 2010). É bem documentado que os fungos participam ativamente na nutrição e desenvolvimento vegetal através da mineralização de compostos orgânicos e inorgânicos, estabelecimento de associações simbióticas com plantas e biossolubilização, que são processos fundamentais por aumentarem a disponibilidade de elementos chave para o desenvolvimento vegetal (Muller et al., 2004; Buée, 2007; Meena et al., 2014). Também atuam no controle biológico de pragas e doenças, na produção de substâncias promotoras do crescimento e biodegradação de resíduos orgânicos e tóxicos (Berg et al., 2005).

Nos ecossistemas onde vivem, os fungos exibem alta diversidade metabólica, que lhes confere importante capacidade de biodegradação de resíduos orgânicos e substâncias

tóxicas por meio da síntese de agentes com capacidade de quelar ou oxidar os poluentes, desta forma destruindo ou removendo-os de forma eficiente (Harms et al., 2011). Estas características tornam-se ainda mais relevantes em ambientes impactados por atividades de mineração. Geralmente, os solos de áreas mineradas e do entorno são saturados de determinados metais ou substâncias químicas, que variam de acordo com o tipo de extração (Gadd, 2010). Fungos capazes de sobreviver em habitats inóspitos como este aprimoraram sistemas de defesa eficientes para garantir a continuidade das espécies e, adaptados a estes tipos de solos desenvolveram uma biossíntese exótica e aumentaram sua capacidade de metabolizar substâncias xenobióticas (Giubilei et al., 2009; Morozkina et al., 2010).

Além da importância ambiental, os fungos do solo apresentam um metabolismo secundário e produção enzimática muito diversificada. A exploração dos metabólitos fúngicos oferece uma grande vantagem com relação a outras fontes como as plantas e insetos, por exemplo, pois os fungos podem ser cultivados em larga escala, até mesmo em meios de cultura de baixo custo, produzindo grandes quantidades de metabólitos sem que haja prejuízos ao ecossistema (Takahashi & Lucas, 2008). Os metabólitos produzidos por fungos são amplamente explorados em uma extensa gama de processos biotecnológicos na indústria, medicina, meio ambiente e agrícola.

Os fungos são importantes produtores de enzimas hidrolíticas, como as proteases, amilases e celulasas que são empregadas em vários setores industriais como, por exemplo, na indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos, couro têxtil, detergentes, engenharia genética e meio ambiente (Esposito & Azevedo, 2010). Também são explorados como produtores de vitaminas, polissacarídeos, polialcóis, lipídios, glicolipídios e pigmentos. Muitos destes produtos já são comercializados, enquanto outros ainda estão em alguma fase de prospecção e desenvolvimento, mas ambos são potencialmente valiosos para a biotecnologia, e de um modo geral têm um grande impacto econômico (Adrio & Demain, 2003).

Estudos demonstraram que fungos do gênero *Penicillium* apresentaram alto potencial de produção de celulase (Maeda et al., 2013) também como promotores do crescimento vegetal (Koike et al., 2001), adsorção relativa de metais pesados no solo e água (Moreira & Siqueira, 2006) na solubilização de fosfatos (Behera et al., 2014), e produção de antibióticos (Adrio & Demain, 2003; Van den Berg et al., 2008).

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* têm sido utilizados em pesquisas e processos que visam a solubilização de rochas ricas em nutrientes para fertilização do solo. Por sua alta capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos, isolados em potencial são explorados agronomicamente e em vários setores industriais (Behera et al., 2014). *Aspergillus niger* é bem descrito na literatura como um importante produtor de ácido cítrico, glucônico, ácido oxálico dentre outros (Magnuson & Lasure, 2004; Joosten et al., 2008) enquanto *Aspergillus terreus* é explorado na produção de ácido itacônico (Magnuson & Lasure, 2004). Estudos realizados com espécies de *Trichoderma* relataram sua eficiência como antagonista a vários fungos fitopatogênicos bem como na promoção do crescimento vegetal (Druzhininal et al., 2011; Consolo et al., 2012).

Algumas espécies de fungos filamentosos apresentam maior valor para a economia em razão não só da sua utilização nos processos biotecnológicos para obtenção de diversos produtos industriais, mas por serem agentes etiológicos de várias doenças que causam sérios prejuízos na produção em várias culturas e na saúde animal, por serem produtores de toxinas e responsáveis pela deterioração de inúmeros produtos (Maia et al., 2006).

Dessa forma, o conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção microbiana têm se intensificado nos últimos anos, tornando-se um dos principais objetivos da indústria e instituições de pesquisa, na busca de fontes de isolados com alto potencial biotecnológico para serem utilizadas nos mais diversos setores. Dentre os exemplos importantes de aplicação dos fungos filamentosos, do ponto de vista agrícola, destaca-se o processo de biossolubilização de minerais, que envolve mecanismos diversos.

2.2.1. Biossolubilização de rochas e produção de ácidos orgânicos

A necessidade de aumentar a oferta de nutrientes que sustente a produção agrícola para atender à crescente demanda global por alimentos tem conferido posição de destaque ao Brasil como altamente dependente de fertilizantes importados. O país importa acima de 90% de fertilizantes principalmente na forma de cloreto de Potássio (KCl). Esta situação tem estimulado a busca de alternativas aos fertilizantes convencionais que valorizem a sustentabilidade da atividade agrícola, além de contribuir para a mitigação dos

potenciais impactos negativos que os fertilizantes sintéticos exercem sobre o equilíbrio ecológico de agroecossistemas (Chaves, 2010; Martins et al., 2010).

A prática de rochagem tem sido utilizada como estratégia para viabilizar a diminuição ou até mesmo a substituição do uso de fertilizantes industriais entre eles o KCl, pelo uso de rochas de ocorrência nacional por meio da exploração de agrominerais alternativos, como por exemplo, as formações glauconíticas “verdete” do Cedro de Abaeté, MG que possuem teor de K_2O que varia de 6 a 14 % (Toledo Piza et al., 2011) e o Flogopito contém em média 7,4% de K_2O (Souza, 2013).

O maior desafio para ampliar o uso desta fonte de nutrientes na agricultura está associado à baixa taxa de solubilidade destes materiais. No entanto, várias pesquisas envolvendo processos físicos, químicos e biológicos têm recebido ênfase visando melhorar a biodisponibilização de nutrientes, em particular, o Fósforo (P) e o Potássio (K), presentes em rochas fosfáticas e silicáticas respectivamente, conforme documentado na publicação “Agrominerais para o Brasil”, coordenada pelo CETEM - Centro tecnológico mineral do MCT - Ministério da Ciência e tecnologia (2010).

Vários estudos demonstram contribuições de micro-organismos selecionados e eficientes em solubilizar K e P a partir de fontes insolúveis ou de baixa solubilidade para aumento da produtividade vegetal (Marriel et al., 2006; Prajapati et al., 2012; Parmar & Sindhu, 2013; Behera et al., 2014, Meena et al., 2014). Uma ampla gama de micro-organismos solubilizadores de K são descritos em vários trabalhos, que incluem bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus spp*, *ferrooxidans*, *Acidithiobacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, dentre outros (Meena et al., 2014).

Segundo Marriel et al. (2006), o aumento da biodisponibilidade *in vitro* de potássio presente em rochas silicáticas pode aumentar em até 40 vezes, quando incubadas na presença de fungos filamentosos pré-selecionados como eficientes. Silva et al. (2015), avaliando a biosolubilização de K a partir da rocha fonolito por três estirpes de bactérias e 10 isolados de fungos, concluíram que uma estirpe de bactéria identificada como *Burkholderia sp.* foi capaz de liberar até 38 mg.L^{-1} em 10 dias de fermentação, enquanto entre os fungos estes valores oscilaram entre 8 e 17 mg.L^{-1} de K. Neste estudo, o isolado F76 (*Aspergillus sp*) foi considerado o mais eficiente, disponibilizando cerca de 30% de K presente na rocha. Resultados similares têm sido relatados em outras pesquisas, em que a quantidade de K

liberado por estirpes de bactérias variaram entre 15 mg.L⁻¹ e 48 mg.L⁻¹ (Parmar & Sindhu, 2013).

Além dos resultados obtidos em experimentos *in vitro*, a utilização de micro-organismos para promover a biossolubilização de agrominerais tem apresentado resultados promissores para substituição ou diminuição do uso dos fertilizantes convencionais em várias culturas (Straaten, 2010). Foi demonstrado que isolados de *Enterobacter hormaechei* e *Aspergillus terreus* estimularam o crescimento de plantas de quiabo (*Abelmoscus Esculentus*) cultivado em solo deficiente em K, com aplicação de uma fonte de baixa solubilidade de K, o feldspato (Prajapati et al., 2013).

Alves et al. (2010), em experimento realizado com eucalipto adubado com a rocha brecha alcalina, verificaram ganhos significativos em altura de plantas, massa seca, o comprimento de raízes, teores de P e K e colonização micorrízicas, quando inoculados com fungos *Pisolithus sp* (UFSC-PT22) e *Pisolithus microcarpus* (Pt186).

A solubilização dos nutrientes é mediada por mecanismos diversos que variam de acordo com a natureza do mineral, do micro-organismo e do ambiente. A produção de ácidos orgânicos e a diminuição do pH do meio são considerados os principais fatores que induzem a solubilização dos nutrientes presentes nas rochas (Parmar & Sindhu, 2013; Behera et al., 2014; Meena, et al., 2014). Diferentes ácidos orgânicos são produzidos pelos fungos. São relatados que os ácidos de baixo peso molecular como: ácido succínico, fumárico, glucônico, itacônico, láctico, málico, micofenólico, oxálico e ácido cítrico, são os mais efetivos na solubilização dos minerais (Behera et al., 2014). A produção de ácidos promove a liberação de íons H⁺ na solução e, conseqüentemente a mudança de pH do meio (Straaten, 2010; Parmar & Sindhu, 2013; Vassilev et al., 2013; Behera et al., 2014; Meena et al., 2014). Neste sentido, foi observado por Lopes-Assad et al. (2006) que a acidificação promovida por estirpes de *Aspergillus niger* favoreceu a elevação da taxa de solubilização de K contido em rocha ultramáfica alcalina e flogopito.

Outros estudos com micro-organismos solubilizadores de K e P demonstram que os processos de quelação e complexação de cátions metálicos também estão associados ao processo de solubilização e disponibilização destes nutrientes para as plantas (Alves, 2006; Meena et al., 2013; Parmar & Sindhu, 2013; Behera et al., 2014). Os ácidos relacionados com a quelação de metais trivalentes como Fe³⁺ e Al³⁺

são principalmente o málico e o cítrico, enquanto o ácido oxálico gera complexação de íons como o K, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Al e Fe (Alves, 2006). Tais eventos podem estar associados com a diminuição da toxicidade destes metais no meio (Magnuson & Lasure, 2004). Em alguns casos, Behera et al. (2014) relatam que a acidificação do meio acontece por meio da liberação de prótons durante a assimilação do NH₄⁺ ou através de processos metabólicos que desencadeiam a protonação, como a respiração.

Neste contexto, a prospecção e seleção de micro-organismos, em particular fungos filamentosos produtores de ácidos orgânicos, tornam-se importantes para a atividade agrícola, indústria alimentícia, farmacêutica, química, têxtil, e biotecnológica, em um mercado que se expande de maneira global. O crescente interesse na utilização de fungos nestes processos pode ser atribuído a diferentes fatores como, facilidade de controle de operações, o baixo custo, baixo consumo de energia e os altos rendimentos observados (Magnuson & Lasure, 2004).

2.3. Biodiversidade de Fungos Filamentosos

De modo geral, a biodiversidade pode ser entendida como a soma total de todas as variações biológicas ao nível de genes nos ecossistemas (Purvis & Hector, 2000). Atualmente, o conceito de biodiversidade tem sido amplamente discutido em vários setores da sociedade e da comunidade científica, principalmente por causa do reconhecimento de sua importância funcional, bem como da necessidade de se conhecer e manter a diversidade biológica.

O Brasil destaca-se como o país que abriga a maior diversidade biológica do planeta, com aproximadamente 20% do total das espécies conhecidas da biosfera (Oliveira et al., 2006; Esposito & Azevedo, 2010) e, possui dois *hotspots* de biodiversidade: a Mata Atlântica e o Cerrado, três grandes ecossistemas marinhos e seis biomas terrestres, com uma média de 700 novas espécies de animais descobertas por ano (Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2015). No entanto, as ações antrópicas como agricultura, mineração, urbanização e desmatamento aliado às emissões de gases de efeito estufa, às mudanças no uso da terra e a introdução de espécies exóticas têm alterado diversos ecossistemas e, como consequência, ameaçado a biodiversidade (Zari, 2014).

As alterações na diversidade biológica podem implicar em desequilíbrio dos processos e funções dos ecossistemas com graves impactos sobre a humanidade, como a redução de

alimentos, combustíveis, recursos genéticos, medicinais e naturais que impulsionam a biotecnologia (Chapin et al., 2000).

Moreira & Siqueira (2006) destacam que normalmente os termos biodiversidade e conservação são relacionados aos indivíduos que vivem acima do solo, enquanto as comunidades de macro e micro-organismos que habitam os solos são frequentemente negligenciadas. No entanto, estas comunidades, em especial os micro-organismos, participam de uma série de atividades imprescindíveis ao estabelecimento da vida na terra.

Embora a essencialidade das funções que os fungos exercem para a manutenção da vida no planeta esteja muito bem documentada na literatura, pouco se conhece sobre a dinâmica populacional e estrutural das comunidades e sua biodiversidade. Estima-se que, existam cerca de 1,5 milhões de fungos, porém somente 5% destes foram descritos (Hawksworth, 2001; Blackwell, 2011). Atualmente, têm sido envidados esforços para o desenvolvimento de pesquisas visando inventariar, quantificar a riqueza de espécies de fungos filamentosos e, conseqüentemente compreender a estrutura e funcionamento das comunidades, bem como traçar estratégias de manejo e conservação, criação de bancos de germoplasma e prospecção para processos biotecnológicos potenciais, principalmente nos países tropicais (Esposito & Azevedo, 2010).

Em áreas degradadas em decorrência das práticas de mineração e áreas de referência com vegetação preservada com pouca ou nenhuma ação antrópica, os trabalhos referentes à diversidade de fungos filamentosos ainda são escassos. Vale salientar que os solos com predominância de derivados ferrosos, como um ambiente pouco explorado, podem conter espécies fungicas desconhecidas ou mesmo espécies conhecidas que, adaptadas a este tipo de ambiente apresentem um metabolismo diferenciado, com possibilidade de utilização em diferentes processos.

Tendo em vista a importância ecológica dos fungos e de seu vasto potencial biotecnológico, o conhecimento da diversidade genética e funcional das comunidades presentes em ambientes naturais e degradados é de grande relevância para o entendimento da composição dos principais grupos dominantes nestes ambientes, e para predição das funções ecológicas que estes têm mediado nos solos, bem como para programas de recuperação de áreas degradadas e restauração ecológica.

Em estudo realizado por Maia et al. (2006) em áreas de Floresta Atlântica ao norte do rio São Francisco, foram listados 37 fungos filamentosos do filo Ascomycota e 5 do filo

Zygomycota, sendo o gênero *Penicillium* predominante. Souza (2010) ao estudar três unidades de conservação da Mata Atlântica em São Paulo encontrou alta diversidade de fungos sendo 114 espécies de Ascomycota na fase anamórfica, 19 na fase telemórfica e nove espécies de Zygomycota. O mesmo autor relata que o gênero *Trichoderma* foi dominante em todas as áreas avaliadas, seguido por *Penicillium* e *Paecilomyces*.

Carvalho (2008) verificou maior riqueza de espécies de fungos em áreas cultivadas com algodão, em relação com uma área de vegetação nativa. Sendo que as espécies de maior ocorrência foram de fitopatógenos (*Fusarium*) e antagonistas (*Trichoderma*) na área cultivada, e *Penicillium* e *Absidia* na área nativa. De modo similar, em relato sobre a ocorrência de diferentes grupos de fungos encontrados em alguns fragmentos florestais do Nordeste, Maia et al. (2006) concluíram que há grande diversidade de fungos nas áreas exploradas, além de detectar a ocorrência de espécies raras e ainda não descritas no Brasil. Segundo estes autores, o conhecimento da biodiversidade fúngica torna possível o desenvolvimento de estratégias de conservação dos locais de ocorrência dos fungos *in situ*, bem como dos centros de conservação *ex situ* para um melhor aproveitamento do seu potencial biotecnológico.

Neste sentido, as coleções de culturas de micro-organismos apresentam importante contribuição para a preservação deste material biológico, manutenção e suprimento de genes e estirpes para os estudos científicos e aplicações tecnológicas. Coleções de culturas são ainda centros de conservação de recursos genéticos *ex-situ*, cujas funções são a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição dos micro-organismos e de células autenticadas e reagentes biológicos certificados (Vazoller & Canhos, 2005). Dessa forma a identificação dos micro-organismos presentes nas coleções contribui para com seu uso futuro a fim de atender as exigências para o conhecimento da biodiversidade e aproveitamento dos recursos genéticos para o benefício da humanidade.

2.4. Técnicas para Identificação e Avaliação da Diversidade de Fungos Filamentosos

Para acessar a diversidade de fungos nos ecossistemas, diferentes metodologias são empregadas. Estas podem ser através de métodos tradicionais de cultivo e observação das características morfofisiológicas e bioquímicas, métodos moleculares tradicionais ou os independentes de cultivo. A diversidade estimada da micota do solo varia em função da

metodologia utilizada (Gams, 2007). Na microbiologia clássica o substrato é coletado, os fungos são isolados e cultivados em meios de cultura em condições de laboratório para posterior identificação e quantificação.

Para isolamento e quantificação de micro-organismos do solo, os métodos de diluição e plaqueamento são os mais utilizados. Esta técnica consiste na diluição seriada a partir de uma quantidade de solo, até a obtenção de uma concentração final desejada (Pfening & Abreu, 2006). As metodologias de cultivo apresentam limitações, uma vez que muitas espécies não são capazes de se desenvolver em meios de cultura, dificultando ou até mesmo impossibilitando a sua identificação (O'Brien et al., 2005). Ainda assim, a possibilidade de isolamento e identificação de fungos são ferramentas importantes no estudo de suas funções (Pfening & Abreu, 2006).

Recentemente, as técnicas moleculares têm permitido avanços nos estudos de diversidade de fungos no solo. A utilização de marcadores moleculares tem sido amplamente realizada para determinação da estrutura genética das populações fúngicas, pois não são influenciados por fatores ambientais (Ferreira & Gratapaglia, 1998). Algumas técnicas de biologia molecular baseadas no DNA de amostras ambientais complexas como o solo, por exemplo, podem estimar a diversidade microbiana sem a necessidade do cultivo (O'Brien et al., 2005).

O uso das técnicas moleculares se tornou importante ferramenta na identificação de fungos filamentosos. Estas técnicas possuem a vantagem de apresentar um processo rápido e de alta sensibilidade e não estão sujeitas aos vários fatores que podem afetar a caracterização morfológica dos fungos, de tal forma que podem ser utilizadas para uma abordagem complementar e mais abrangente, possibilitando solucionar dúvidas taxonômicas (Mello et al., 2011; Das et al., 2014).

A partir do desenvolvimento da PCR (Reação em cadeia da polimerase) novas técnicas em biologia molecular possibilitaram a análise de polimorfismos em diferentes conjuntos de organismos. Várias técnicas baseadas em PCR são utilizadas para identificação e estudos de diversidade genética em fungos, entre as quais se destacam o uso de marcadores moleculares, como o sequenciamento da região espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA, o rep-PCR (“repetitive sequence based-PCR”), por meio do elemento BOX e ISSR (“Inter simple sequence repeat”).

Alguns marcadores moleculares detectam e caracterizam múltiplos alelos em determinados locos, dessa forma são comumente utilizados para confecção de “DNA fingerprintings”, frequentemente usados para estimar a diversidade genética de micro-organismos e programas de melhoramento vegetal e animal (Alves et al., 2007; Chial, 2008).

2.4.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica descrita por Saiki et al. (1985) que permite a obtenção *in vitro* de várias cópias de um determinado segmento de DNA. Consiste em uma reação enzimática catalisada por uma enzima termoestável: a DNA polimerase e componentes como desoxirribonucleotídeos (dNTP's) e primers, ou oligonucleotídeos.

A reação de PCR se processa automaticamente em um aparelho termociclador programado para a realização de ciclos repetidos de três etapas: (i) desnaturação para separação da dupla hélice de DNA, (ii) anelamento do “primer” e (iii) extensão dos “primers” pela enzima DNA polimerase, através da inserção dos nucleotídeos correspondentes, tornando a fita dupla (Eiseinstein, 1990). Teoricamente a cada ciclo a sequência demarcada pelo primer é duplicada e após uma reação de aproximadamente 30 ciclos obtém-se ao final cerca de um bilhão de cópias do DNA de interesse (Figura 1).

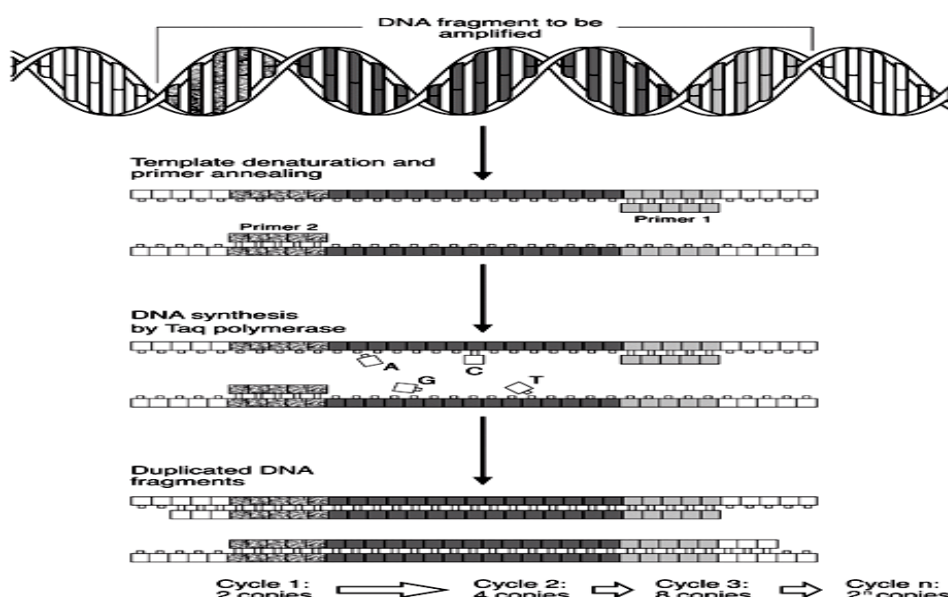


Figura 1. Representação do processo de amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Por sua versatilidade, rapidez e sensibilidade, a PCR é uma poderosa ferramenta em uma variedade de estudos genéticos moleculares e largamente empregada nos estudos de micro-organismos. As aplicações da PCR na micologia são extensas como salientado por Edel (1998). Esta técnica é utilizada nos estudos em genética de fungos, taxonomia e filogenia, ecologia e microbiologia do solo, fitopatologia, medicina, biotecnologia, entre outros. Fungaro (2000) ressalta a importância desta técnica para a segurança alimentar e fitossanitária, através da detecção de fungos em vegetais e alimentos, bem como para ciência médica e forense.

2.4.2. Sequenciamento da região ITS

O DNA ribossômico (rDNA) são sequências de DNA que codificam o RNA ribossomal. Estas sequências ocorrem em múltiplas cópias no genoma e são agrupadas em repetições em tandem. O rDNA é altamente conservado no genoma, formado pelos genes 18S, 5.8S e 28S em fungos e de duas regiões espaçadoras intergênicas variáveis denominadas espaçador interno transcrito (ITS) (Figura 2). A região intergênica transcrita apresenta cerca de 650 pb que são separadas em sub regiões designadas ITS1, ITS2, as quais flanqueiam o gene 5.8S ribossomal e pode ser amplificada usando oligonucleotídeos iniciadores universais (White et al., 1990; Das et al., 2014).

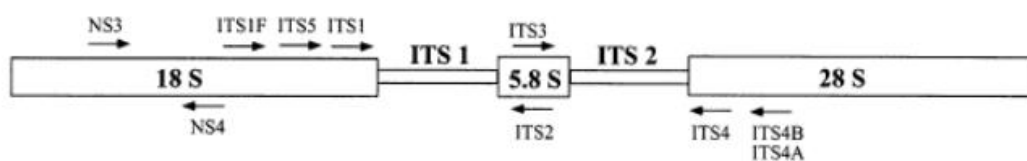


Figura 2. Representação esquemática das regiões de rDNA de fungos e primers universais. ITS: Espaço Interno Transcrito.

A amplificação da região do espaço interno transcrito (ITS) do rDNA tem sido uma ferramenta útil na identificação de espécies de fungos (Porter & Golding, 2011). Por meio da elaboração de primers para eucariotos baseados nesta região, foi possível sua utilização para uma grande variedade de espécies fungicas (White et al., 1990). Por ser uma região altamente conservada e com alto grau de variabilidade possibilita a distinção ao nível intra e interespecífico de várias espécies de fungos (Fungaro, 2000).

Segundo Nilsson et al. (2008), a região ITS apresenta a sequência nucleotídica mais empregada em estudos de sistemática e taxonomia na micologia. Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência do sequenciamento baseado na região ITS em estudos de variabilidade genética, localização geográfica e taxonomia de fungos (Velásquez, et al, 2007; Porter & Golding, 2011). Esta região tem sido proposta como um marcador potencial de “barcode” para fungos (Schoch et al., 2012).

2.4.3. ISSR (“Inter simple sequence repeat”) e rep-PCR (“Repetitive sequence based-PCR”)

As sequências curtas com até seis nucleotídeos repetidas no genoma de vários organismos e distribuídas ao acaso são denominadas microssatélites (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A taxa de evolução dentro dos microssatélites é considerada elevada, de modo que a probabilidade de polimorfismo nestas sequências é maior (Reddy et al., 2002). Por tal motivo, este tipo de sequência pode ser utilizado como marcador molecular através tanto da utilização de iniciadores externos aos microssatélites quanto da utilização do próprio microssatélite como iniciador. Esta técnica é conhecida como ISSR (“Inter simple sequence repeat”). Neste caso, as sequências nucleotídicas simples entre as regiões microssatélites são amplificadas por meio de iniciadores homólogos que podem constituir-se de dois a cinco nucleotídeos (Reddy et al., 2002).

Esta técnica é amplamente explorada na micologia em estudos de diversidade genética, relações filogenéticas, caracterização, taxonomia dentre outros (Zhou et al., 2001). Por ser multiloco, este marcador não exige conhecimento específico do genoma a ser estudado (Mishra et al., 2003). Além disso, apresenta uma variedade de utilizações, entre elas a produção de “fingerprintings” genômicos para várias espécies de fungos, nos estudos de diversidade genética, caracterização de polimorfismos entre populações e análise filogenética (Reddy et al., 2002). Nagaoka e Ogihara (1997) consideram esta técnica superior ao RFLP e RAPD, pela facilidade, baixo custo, grande reprodutibilidade e obtenção de padrões altamente polimórficos.

No trabalho realizado por Consolo et al. (2012), 12 primers ISSR foram utilizados para detectar variabilidade genética entre 33 isolados de *Trichoderma* isolados de Buenos Aires, Argentina. Os autores concluíram que os marcadores permitiram a discriminação

molecular dos isolados testados. Batista et al. (2008) utilizaram os marcadores ISSR, RAPD e ITS para caracterização genética de isolados de *Aspergillus flavus*. Eles encontraram alta diversidade utilizando os primers ISSR (GACA)₄ e (GTG)₅ e ressaltaram a importância do uso de marcadores moleculares como ferramenta para auxiliar na diferenciação de espécies de fungos e estirpes.

Outra técnica muito utilizada na caracterização molecular de micro-organismos é o rep-PCR (“Repetitive sequence based-PCR”) que consiste na determinação do perfil genético por meio da amplificação de regiões altamente conservadas e repetidas do DNA (Das et al., 2014; Smith et al., 2001). Foram identificadas três famílias de sequências repetitivas, sendo a sequência REP (“Repetitive extragenic palindromic”) que apresenta 35 a 40 pb (Stern et al., 1984), a sequência ERIC (“Enterobacterial repetitive intergenic consensus”) com 124 a 127 pb (Hulton et al., 1991) e o elemento BOX com 154 pb (Martin et al., 1992).

A técnica rep-PCR tem sido amplamente utilizado na obtenção de fingerprints em bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Versalovich, 1994; Gillings & Holley, 1997; Berg et al., 2005). Embora primers rep-PCR tenham sido desenvolvidos para genomas procarióticos, estes têm sido aplicados com sucesso na caracterização de variabilidade de vários gêneros de fungos (Mehta et al., 2002; Berg et al., 2005; Abdollahzadeh & Zolfaghari, 2014). Para genotipagem e geração de um fingerprinting genômico de isolados do fitopatógeno *Phaeoacremonium* e *Phaeoconiella*, Alves et al. (2004) utilizaram a técnica de rep-PCR (REP, ERIC e BOX) e MSP-PCR. Os autores concluíram que através dos padrões obtidos foi possível detectar claramente diferenças intra e interespecíficas. Neste trabalho, foi proposto que esta técnica pode ser usada como uma estratégia complementar a outros métodos moleculares para identificação de espécies e isolados dos gêneros estudados.

Berg et al. (2005) utilizaram o elemento BOX para geração de um fingerprinting de DNA de fungos rizosfericos com ação antagônica ao patógeno *Verticillium daleae*. A partir dos padrões gerados por BOX os autores puderam selecionar isolados de diferentes grupos para sequenciamento e identificação dos isolados. A aplicação de uma ou mais técnicas de biologia molecular, aliada aos métodos de microbiologia convencionais, proporciona uma melhor identificação e compreensão da diversidade microbiana (Das et al., 2014).

2.5. Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais e o Centro de Biodiversidade da Vale S.A (CeBio)

O Quadrilátero Ferrífero (QF) está localizado na porção centro-oeste do Estado de Minas Gerais. Abrange uma área de cerca de 7.000 km² e compreende cinco grandes conjuntos de unidades rochosas: Complexos metamórficos, Super-grupo Rio das Velhas, Super grupo Minas, Grupo Sabará e Grupo Itacolomi.

A região do QF ocupa posição de destaque no setor de mineração. É reconhecido por sua vasta riqueza mineral, em função de importantes depósitos de ouro e reservas de ferro (Azevedo et al., 2012). Juntamente com a serra dos Carajás, PA e Morraria de Urucum, MS representam cerca de 20% das reservas mundiais de ferro (Carmo et al., 2011). Os solos encontrados no QF são muito diversificados quanto à classificação, representado em sua grande maioria por álicos ou distróficos, sendo predominante o latossolo vermelho com altos teores de ferro (Azevedo et al., 2012).

O Quadrilátero Ferrífero, MG, é considerado de “importância biológica extrema” para a conservação da biodiversidade no estado (Costa, 1998) em razão da grande diversidade geológica e topográfica da região e consequentemente a sua riquíssima biodiversidade (Azevedo et al., 2012). É considerada uma das regiões que apresentam maior diversidade florística da América do Sul com mais de 30% de endemismo em sua flora (Jacobi & Carmo, 2008). Apesar disso, ainda é um ecossistema pouco estudado embora altamente ameaçado, principalmente por causa da intensa atividade mineradora associada a seus afloramentos de ferro.

A mina Córrego do meio é considerada a mais antiga na região do Quadrilátero Ferrífero. A mina de ferro sobre atual controle da Empresa Vale do Rio Doce S/A foi explorada durante 65 anos e desativada em 2005, estando em processo de recuperação ambiental desde então. Atualmente a mina abriga o Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio) criado em 27 de junho de 2008 (Azevedo et al., 2012). O CeBio apresenta grande representatividade de Campos Rupestres (Vegetação de Canga) e está inserido entre dois importantes hotspots brasileiros: a Mata Atlântica e o Cerrado. Estes são considerados regiões com maior biodiversidade do mundo, bem como áreas remanescentes do processo de mineração (Capim) e regiões reflorestadas com Eucalipto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização dos Sítios de Coleta das Amostras e Reativação dos Isolados de Fungos Filamentosos Depositados na Coleção de Micro-organismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-EMS).

Os fungos filamentosos analisados no presente trabalho pertencem à CMMF-EMS, Sete Lagoas. Estes isolados foram obtidos a partir de amostras de solo coletadas, entre novembro de 2013 e março de 2014, em cinco áreas do Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização das áreas de coleta no Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio).

Abreviação	Área	Caracterização
Cg	Canga	Ambiente preservado, com vegetação de campos rupestres sob afloramentos rochosos ferruginosos.
Ma	Mata	Vegetação secundária, originalmente pertencente ao bioma Mata Atlântica
Ce	Cerrado	Ambiente preservado, vegetação de Cerrado
Eu	Eucalipto	Floresta antrópica composta por plantio de Eucalipto, a qual apresentava vegetação secundária proveniente de recrutamento natural
Cp	Capim	Área minerada em recuperação, composta por taludes revegetados com capim gordura (<i>Melinis minutiflor</i>), que fazem parte de ações de recuperação ambiental da mesma.

Parte das amostras de solo foi enviada ao laboratório de Química e Fertilidade do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, para análise química das mesmas (Anexo I).

O CeBio está localizado na antiga mina Córrego do Meio, no município de Sabará, Minas Gerais (19°51'41''- 19°52'12''S; 43°47'50''- 43°46'59''O). Este está inserido na sub-bacia hidrográfica do Rio das Velhas, unidade morfoestrutural do Quadrilátero Ferrífero (QF) (Figura 3). O clima predominante na região é o tropical de altitude (Cwa), caracterizado por invernos frios e secos e verões quentes e úmidos, com precipitação média anual em torno de 1.700 mm e temperatura média em torno de 22°C.

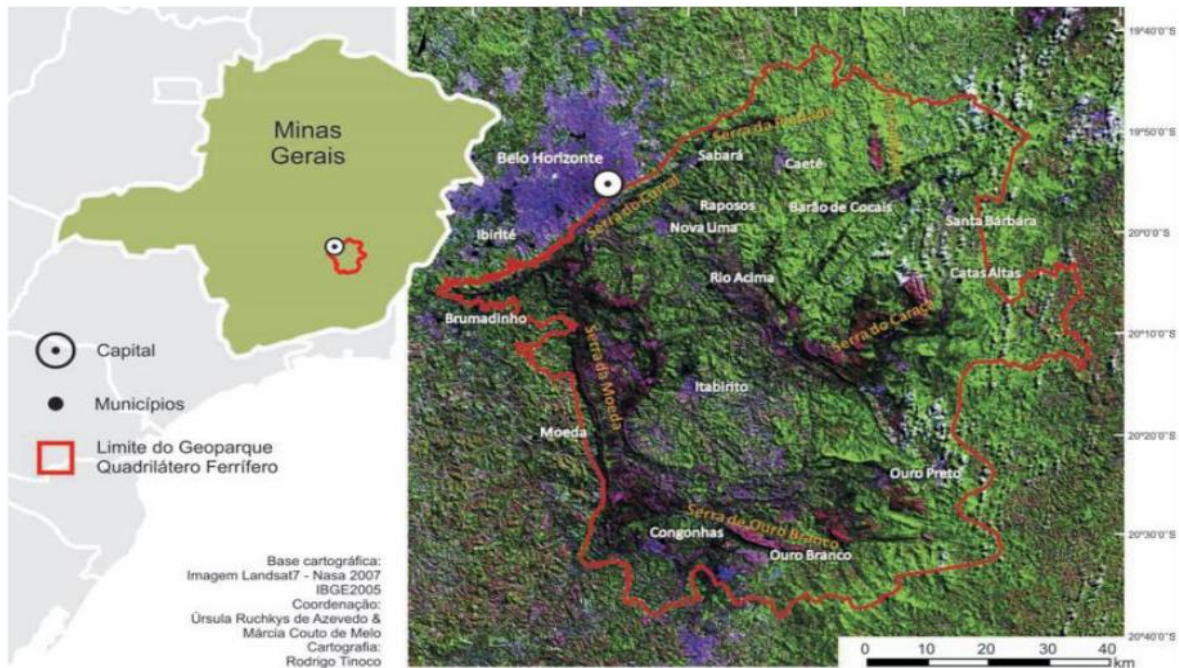


Figura 3. Localização geográfica do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (Azevedo et al., 2012).

Do total de 692 isolados da coleção, preservados em óleo mineral estéril, foram selecionados aleatoriamente 186 isolados com características morfológicas variáveis para teste de pureza e posterior caracterização molecular e funcional.

Para reativação e avaliação da pureza das culturas, efetuou-se a transferência de micélio de cada isolado para placa de petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) e incubou-se durante sete dias, à temperatura de 25°C.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Solo, e a caracterização molecular dos isolados foi realizada nos laboratórios de Ecologia Microbiana e de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

3.2. Caracterização Molecular

Baseado na variabilidade morfológica das colônias fungicas, foram selecionados 186 isolados para caracterização molecular.

Para obtenção da massa micelial, os isolados foram reativados em placa de petri contendo meio BDA e mantidos a temperatura ambiente por 5 dias. Após este período, fragmentos de micélio foram transferidos para erlenmeyers contendo 30 mL de caldo tripton de soja (TSB) previamente esterilizado acrescido de 300 µL de

estreptomicina (30 mg/L). Os frascos foram mantidos em temperatura e luz ambiente durante 72 horas. Após este período o micélio foi coletado, lavado em água destilada estéril e seco em papel filtro estéril. Posteriormente, as amostras foram envolvidas em papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento das extrações de ácidos nucleicos.

3.2.1. Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando-se a metodologia descrita por Saghai Maroof et al (1984) adaptada. Aproximadamente 1000 mg do micélio foi transferido para um almofariz contendo uma pequena quantidade de PVP (PVP K10, MW 10.000) e nitrogênio líquido.

Com auxílio de um pistilo, o material foi macerado até completa pulverização e homogeneização da amostra. Em seguida, aproximadamente 200 mg do macerado foi transferido para um tubo de polipropileno de 2 mL com 800 µL de tampão CTAB [CTAB 2% (m/v); NaCl 1,4 M; Tris- HCl 0,2 M (pH 7,5); EDTA 0,02 M (pH 8,0)] contendo 0,1 mg de proteinase K, carvão ativado a 0,5% (p/v) e 40µL de β-mercaptoetanol 2% (v/v), e incubadas em banho-maria a 65°C por 60 minutos, agitando-se ocasionalmente o tubo.

Após este período as amostras foram resfriadas no gelo por 5 minutos e efetuou-se uma lavagem com igual volume de clorofórmio-octanol (24:1; v/v). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas em agitador por inversão durante 15 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos em Centrífuga Eppendorf (Modelo 5424), e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 1.000 µL de isopropanol gelado (-20°C) e acondicionados no freezer por no mínimo 1 hora.

Em seguida, os tubos foram centrifugados novamente, conforme descrito anteriormente, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 200µL de etanol 70% gelado a -20°C. Os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm (Eppendorf 5424) e o sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol residual.

Os *pellets* de DNA foram ressuspensos em 100 µL de tampão TE contendo 0,2 µL de RNase a 10mg/mL (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e deixados em banho-maria por 30 minutos. Em seguida, a concentração e pureza das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 e ajustada para 50 ng/µL, diluindo-se o DNA estoque em água ultrapura. O DNA obtido foi estocado a -20° C.

A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (0.04 M Tris-Acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0), corados com Gel Red™ (Biotium, Hayward, Califórnia, USA). Após a eletroforese, os géis foram visualizados em luz UV e fotodocumentados no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, USA).

3.2.2. Caracterização da diversidade genética por BOX-PCR e ISSR

A diversidade genética dos fungos filamentosos foi efetuada através das técnicas de ISSR e BOX-PCR. Para tal, 186 isolados foram genotipados via reação de amplificação de sequências curtas simples entre repetições (ISSR) por PCR com o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (Svec et al., 2005) e 122 isolados com o iniciador BOX AIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994).

As reações de amplificação por PCR foram preparadas em duplicata com um volume final de 20 µL, contendo 50 ng de DNA, 2 µM do primer, 20,2 µM dNTPs, 2 µl de 10X Dream Taq Buffer (20 mM MgCl₂), BSA 0,05% e 1,25 U de Dream Taq DNA polimerase (Fermentas Life Science, USA).

As condições da reação de rep-PCR foram: desnaturação inicial de 94° C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 53° C, 8 minutos a 65° C e uma extensão final de 16 minutos a 72° C (Versalovic et al., 1994). As condições da reação de ISSR-PCR foram: desnaturação inicial de 94° C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94° C, 45 segundos a 56° C, 2 minutos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72° C (Svec et al., 2005). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador modelo Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems, EUA).

Após o término da reação os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, durante 2 horas a 100 V. Logo após a eletroforese, o gel foi mantido sob

agitação em solução de Gel Red™ (Biotium, Hayward, Califórnia, USA) diluída 3.300x em 0,1 M NaCl por 20 minutos. Em seguida foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, USA).

3.2.3. Identificação dos isolados a partir da amplificação da região ITS do rDNA e sequenciamento

Após análise de agrupamento por ISSR, para cada cluster formado com mais de 70% de similaridade, foram selecionados ao acaso 1 a 2 isolados representantes de cada grupo para sequenciamento do DNA, totalizando 107 isolados.

A região correspondente ao Espaço Interno Transcrito (ITS) e o gene 5.8S localizada entre os genes ribossomais 18S-28S dos fungos, foram amplificados com os iniciadores ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTCTTGATATGC-3') (White et al., 1990).

As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA, 0,4 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µg/µL de BSA (Albumina soro bovino), 2,5 µL de 10X de Dream Taq Buffer contendo 20 mM MgCl₂, 1,25 U de Dream Taq DNA polimerase (Fermentas Life Science, USA) e água ultrapura para completar o volume da reação.

As condições para amplificação do fragmento foram de um ciclo para a desnaturação a 95° C por 2 minutos, seguidas de 34 ciclos a 95° C por 50 segundos, 55° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto para anelamento e a elongação final a 72° C, por 10 minutos. As demais etapas seguiram conforme descrito acima.

Para o sequenciamento, os amplicons foram purificados utilizando-se o kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, E.U.A) conforme as instruções do fabricante. A concentração do amplicon purificado foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Uniscience) e sua concentração ajustada para 30 ng/µL.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit ABI Prism™Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), no sequenciador modelo ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Para sequenciamento foi utilizado o iniciador ITS1F.

As sequências foram editadas manualmente usando o programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation®) para geração da sequência consenso de cada isolado, posteriormente foram comparadas no GenBank através do programa BLASTN no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.2.4. Análise Filogenética

Para reconstrução filogenética foram selecionadas sequências da região ITS1-5.8S-ITS2, correspondentes aos táxons analisados no estudo taxonômico preferencialmente sequências de espécies TIPO, seguidas de sequências referência indicadas pela plataforma Bold (boldsystems.org) e pela ferramenta BLASTN. Estas foram alinhadas juntamente com as sequências obtidas neste estudo com o software CLUSTAL X (Larkin et al., 2007), os parâmetros para alinhamento foram alterados (“gap opening” para 3 e “delay divergent sequences” para 60%). Em seguida o alinhamento foi corrigido visualmente e a reconstrução filogenética realizada pelo método de Máxima verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980) com 1000 replicações de bootstrap através do programa MEGA.6 (Tamura et al., 2011). A espécie *Fusarium inflexus* foi utilizado como grupo externo nestas análises.

3.3. Avaliação da Capacidade de Biossolubilização de Potássio e Produção de Ácidos Orgânicos *in vitro* por Fungos Filamentosos

Para avaliar a capacidade de biossolubilização de Potássio e a produção de ácidos orgânicos por fungos filamentosos, foram selecionados nove isolados de fungos filamentosos conforme a Tabela 2:

Tabela 2. Isolados de fungos filamentosos utilizados para avaliação da capacidade de biossolubilização de Potássio e produção de ácidos orgânicos.

Identificação do isolado (CMMF-CNPMS)	Identificação no <i>GenBank</i> ¹	Local de isolamento ²
CMSV 844	<i>Trichoderma harzianum</i>	Mata
CMSV 502	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Canga
CMSV 870	<i>Trichoderma harzianum</i>	Eucalipto
CMSV 200	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Canga
CMSV 296	<i>Penicillium sp.</i>	Eucalipto
CMSV 798	<i>Penicillium sp.</i>	Cerrado
CMSV 947	<i>Penicillium simplicimum</i>	Canga
CMSV 250	<i>Penicillium sp.</i>	Cerrado
CMSV 733	<i>Mucor fragilis</i>	Capim

¹ Identificação de isolados de fungos filamentosos por sequenciamento da região ITS do rDNA pela ferramenta BLAST N em comparação com o material encontrado no *GenBank*² Área de coleta dos fungos na Mina Córrego do Meio, Sabará, MG

Cada isolado teve sua capacidade de solubilização e produção de ácidos orgânicos avaliadas em dois tipos de pó de rocha: Verdete de Abaeté e Flogopito. O delineamento experimental adotado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 10x2 com três repetições. O controle consistiu do meio de cultura sem o inóculo, somente com o pó de rocha.

A atividade de solubilização e a produção de ácidos orgânicos dos isolados foram avaliadas em erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio líquido (MSK), com a seguinte composição (g/L): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,6; $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, 0,2; $\text{MgSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2; FeCl_3 , 0,01; Glucose, 30 e 1 mL de solução micronutriente (ZnSO_4 , 0,012; H_3BO_3 , 0,0056; MnCl_2 , 0,003; CuSO_4 , 0,0010; Na_2MoO_4 , 0,0012) (Liaud et al., 2014, adaptado). Os meios foram suplementados com 0,5% de pó de rocha como única fonte de Potássio e o pH foi ajustado para 5,5.

Cada frasco foi inoculado com cinco discos de micélio de 8 mm de diâmetro de cada isolado cultivado durante 10 dias em meio Agar-batata e incubado sob agitação de 100 rpm, à temperatura de 28° C. por 14 dias. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 min, filtradas em filtro de papel whatman nº 42. Nos sobrenadantes, foram determinados os teores de ácidos orgânicos, de K e pH.

Os teores de K foram determinados por Espectrofotometria de Emissão Atômica por Plasma (ICP) (Varian, 725e). A quantificação dos ácidos orgânicos oxálico, láctico, e cítrico foram determinados por HPLC (“High Performance Liquid Chromatographic”) (Water Alliance e2695). Foi utilizada a coluna SHODEX KC 811 e a separação ocorreu a 65°C,

sendo a fase móvel H_3PO_4 0,1% com um fluxo de 0,6 mL/min. A detecção foi realizada em detector de arranjo de fotodiodos (PDA) a 210 nm e área do pico foi utilizada para calcular a concentração de cada ácido orgânico.

A quantificação de ácidos orgânicos foi realizada no Laboratório de Agroquímica e a quantificação do Potássio foi realizada no Laboratório de Fertilidade dos Solos, ambos na Embrapa Milho e Sorgo.

3.4. Análise Estatística

Para a análise dos padrões de “fingerprinting” geradas por BOX-PCR e ISSR-PCR, a matriz de similaridade entre as amostras foi inferida a partir de imagens dos géis de agarose, usando o programa BioNumerics versão 6.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) com o método Jaccard, posteriormente foi construído um dendrograma pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group With Mathematical Average) e uma tolerância de posição 3%.

Os resultados da quantificação de K e ácidos orgânicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa SISVAR 5.3®. O teste de correlação de Pearson foi realizado no programa minitab 14.0.7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da Diversidade Genética por BOX-PCR e ISSR

A genotipagem realizada através de técnicas de BOX-PCR e ISSR foi eficiente para evidenciar polimorfismo entre os isolados estudados, uma vez que as reações de amplificação apresentaram reprodutibilidade (Figura 4). Para Ferreira & Grattapaglia (1998) a reprodutibilidade do método está associada à qualidade do DNA e a padronização das condições de reação.

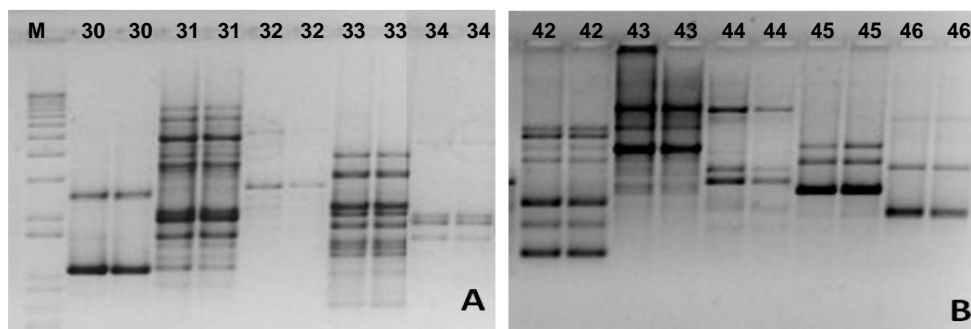


Figura 4. Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose (1,5%) de isolados de fungos filamentosos, usando os primers BOX A1R (A) e GTG₍₅₎ (B). Marcador de peso molecular: 1kb Invitrogen Plus

A amplificação do DNA dos fungos com esses iniciadores gerou perfis de 2 a 13 fragmentos em ISSR e 2 a 10 em BOX. Cerca de 90% dos isolados testados foram amplificados com a técnica ISSR utilizando o iniciador GTG₍₅₎. Os 10% restantes não apresentaram produto de amplificação ou não apresentaram boa resolução e, portanto, foram excluídos da análise.

Para o iniciador BOX-PCR, 66% dos isolados foram genotipados positivamente, os 34% restantes não apresentaram produto ou os perfis apresentaram baixa resolução. Assim a amplificação por BOX-PCR foi menos eficiente quando comparada ao ISSR- GTG₍₅₎. Além disso, as amplificações geradas por BOX-PCR apresentaram qualidade inferior as do ISSR no que diz respeito ao perfil de bandeamento (Figura 5)

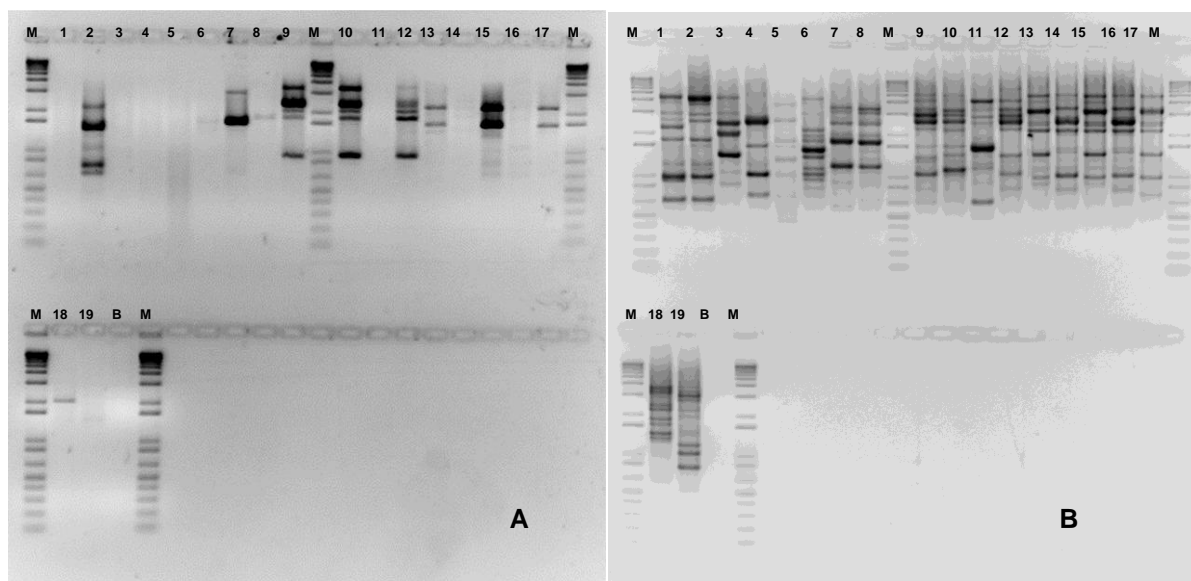


Figura 5. Perfil de amplificação de 19 isolados de fungos filamentosos em gel de agarose (1,5%), através das técnicas de BOX-PCR(A) e ISSR-GTG₍₅₎(B).Mm: 1kb plus (Invitrogen).

Considerando que a qualidade da imagem quanto à resolução das bandas é um pré-requisito para análise nos padrões de fingerprinting e pela maior eficiência na amplificação das amostras, o método ISSR-GTG₍₅₎ foi escolhido como método de genotipagem para avaliação da diversidade dos fungos provenientes de diferentes locais de isolamento e da estimativa da variabilidade dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Dos 168 isolados genotipados por ISSR, 26% foram oriundos da vegetação de Canga, 16% de Capim, 22% de Mata, 17% de Eucalipto e 19% da área de Cerrado.

A genotipagem obtida pela amplificação do DNA fúngico a partir do iniciador GTG₍₅₎ demonstra a diversidade genética dos fungos em cada um dos locais onde foram isolados (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10). Estes perfis permitiram a construção de uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard, gerando assim um dendrograma pelo método UPGMA.

Para a análise dos dendrogramas foi estipulado uma linha de corte de 50% de similaridade para melhor definição do agrupamento dos isolados. Comparando os 44 isolados obtidos na área de Canga, observou-se variação no coeficiente de similaridade de 16% a 100%. Ao nível de 50% de similaridade houve formação de 13 clusters contendo dois a sete isolados, e ainda oito isolados que não foram agrupados (Figura 6).

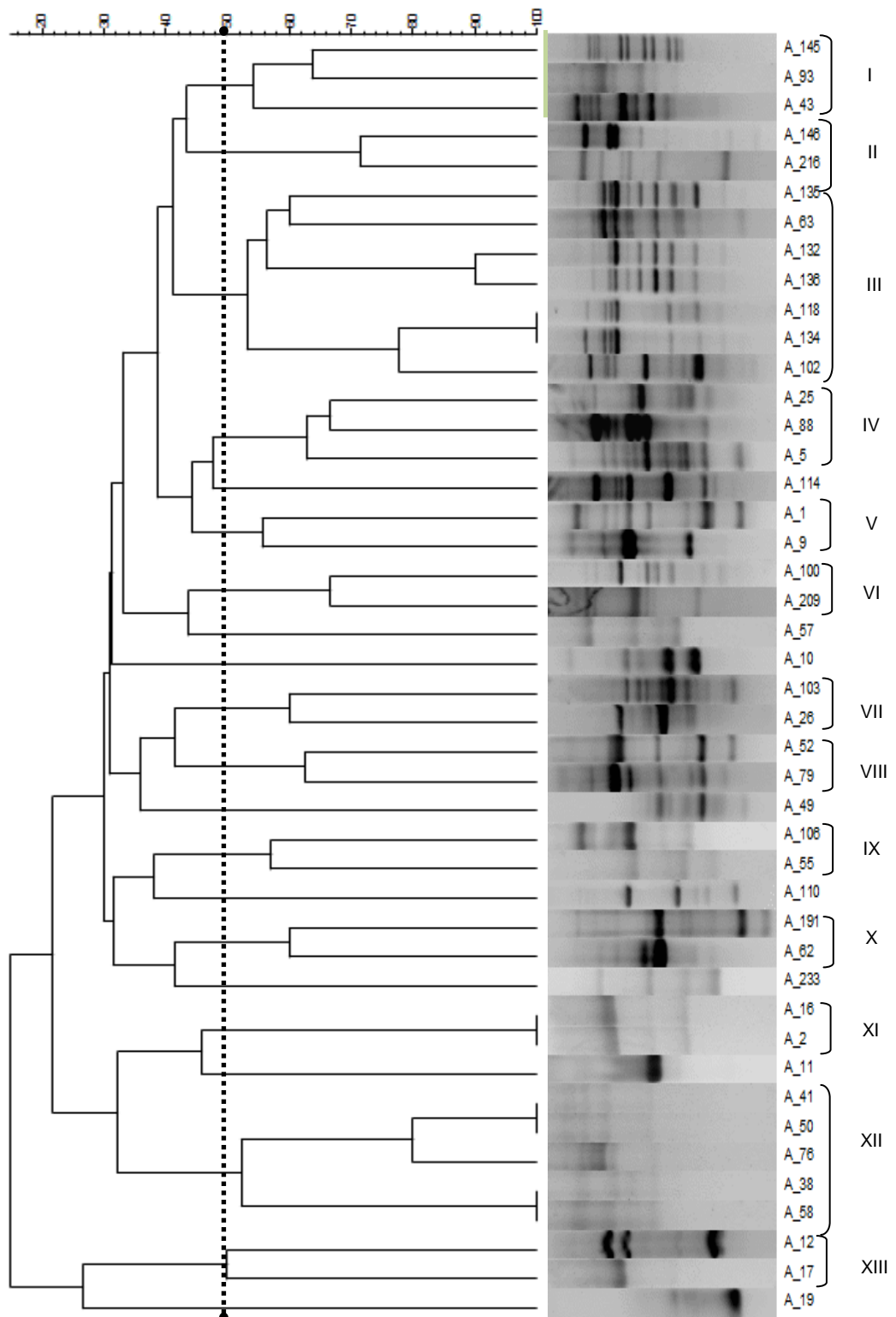


Figura 6. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de fungos filamentosos isolados de vegetação de Canga com o iniciador $GTG_{(5)}$.

Na área minerada revegetada com Capim, observou-se que no perfil de bandejamento para os 27 isolados, o coeficiente de similaridade variou entre 32% a 86%. Para tal, houve a formação de sete clusters contendo dois a sete isolados e quatro isolados que não foram agrupados (Figura 7).

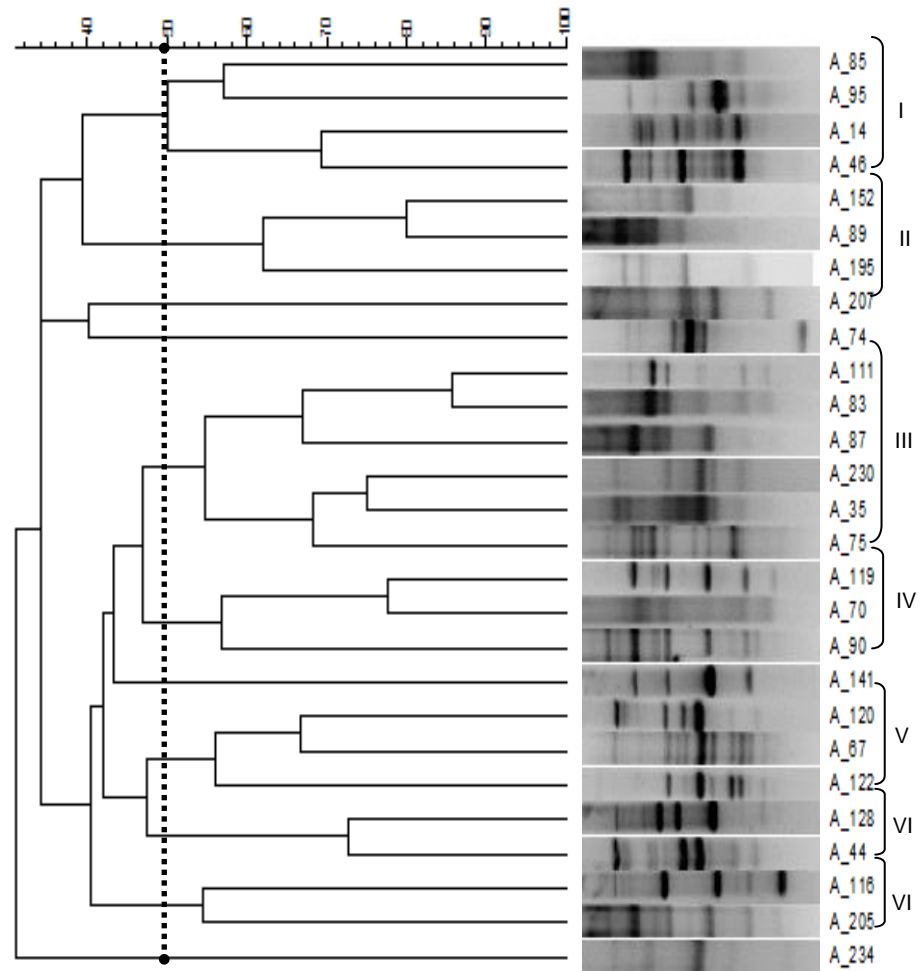


Figura 7. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de fungos filamentosos isolados de área minerada revegetada com Capim, com o iniciador GTG (5).

Em Mata, o coeficiente de similaridade variou de 38 a 100% para os 37 isolados. Foi observado a formação de quatro clusters com seis a 12 isolados e ainda três isolados que não foram agrupados (Figura 8).

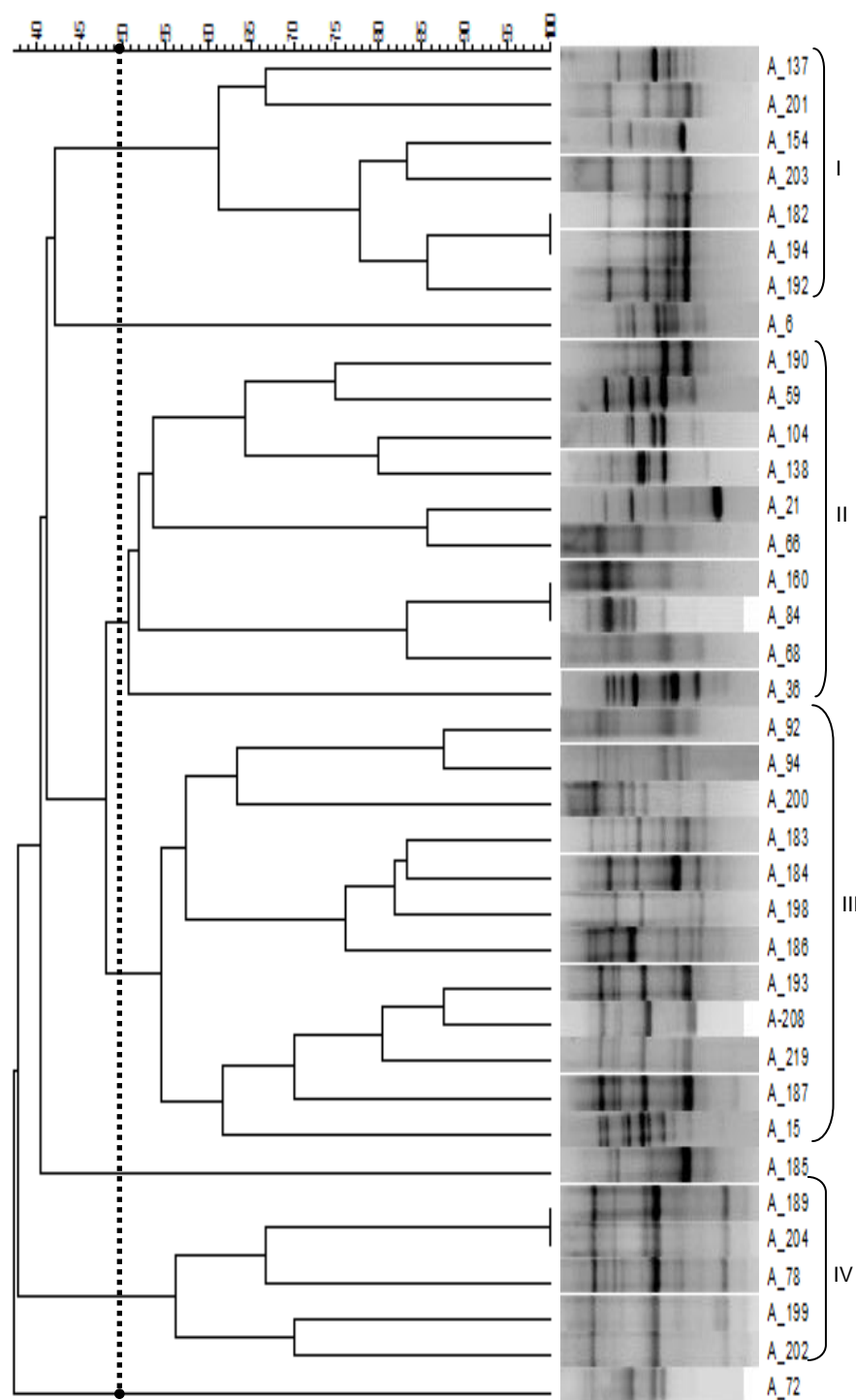


Figura 8. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de fungos filamentosos isolados de Mata Atlântica, com o iniciador $GTG_{(5)}$.

Na área Eucalipto, para os 29 isolados, foi observado a formação de oito clusters, contendo dois a seis isolados e um isolado que não foi agrupado (Figura 9). O coeficiente de similaridade variou entre 28% a 100%.

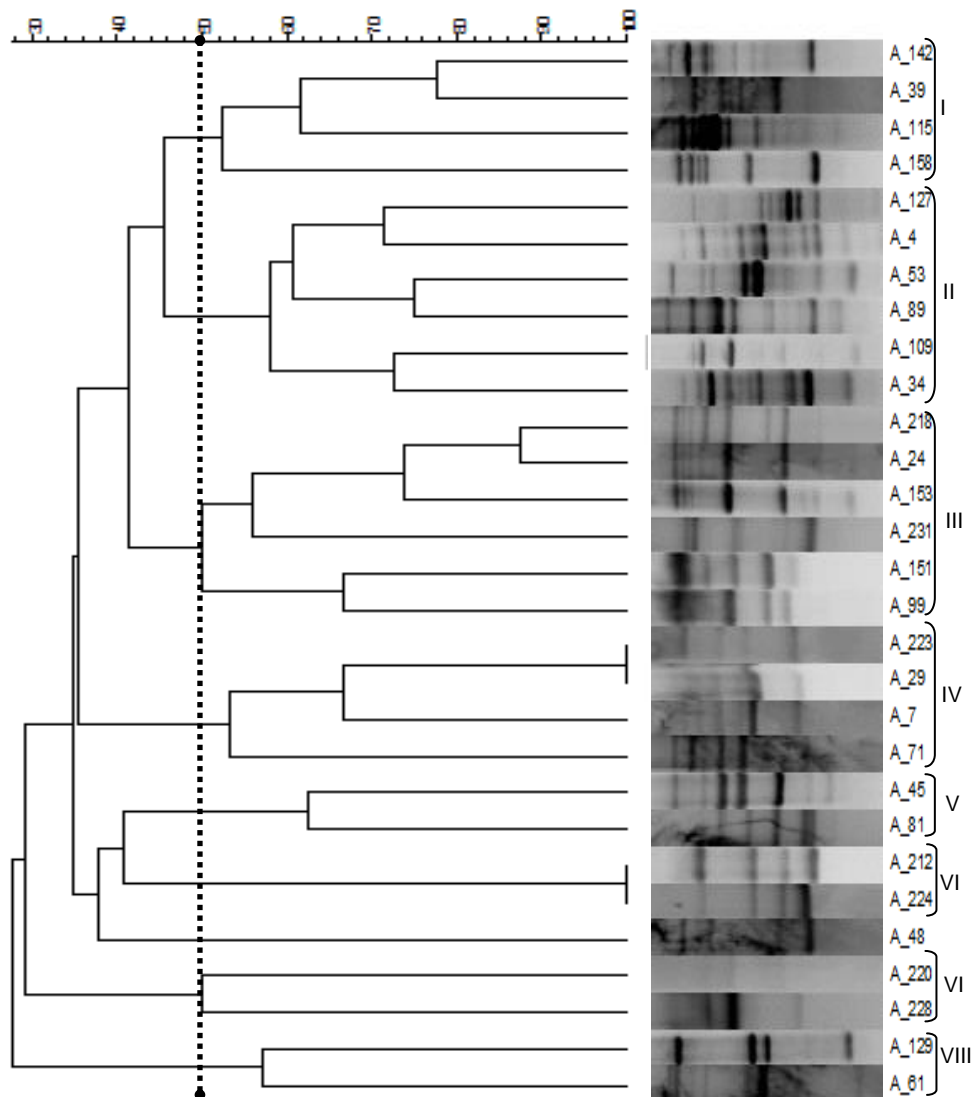


Figura 9. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de fungos filamentosos isolados de floresta de Eucalipto, com o iniciador GTG₍₅₎.

Na área Cerrado o coeficiente de similaridade para 31 isolados variou entre 22 a 100%. Foi observado a formação de nove clusters contendo dois a cinco isolados, além de cinco isolados que não foram agrupados (Figura 10).

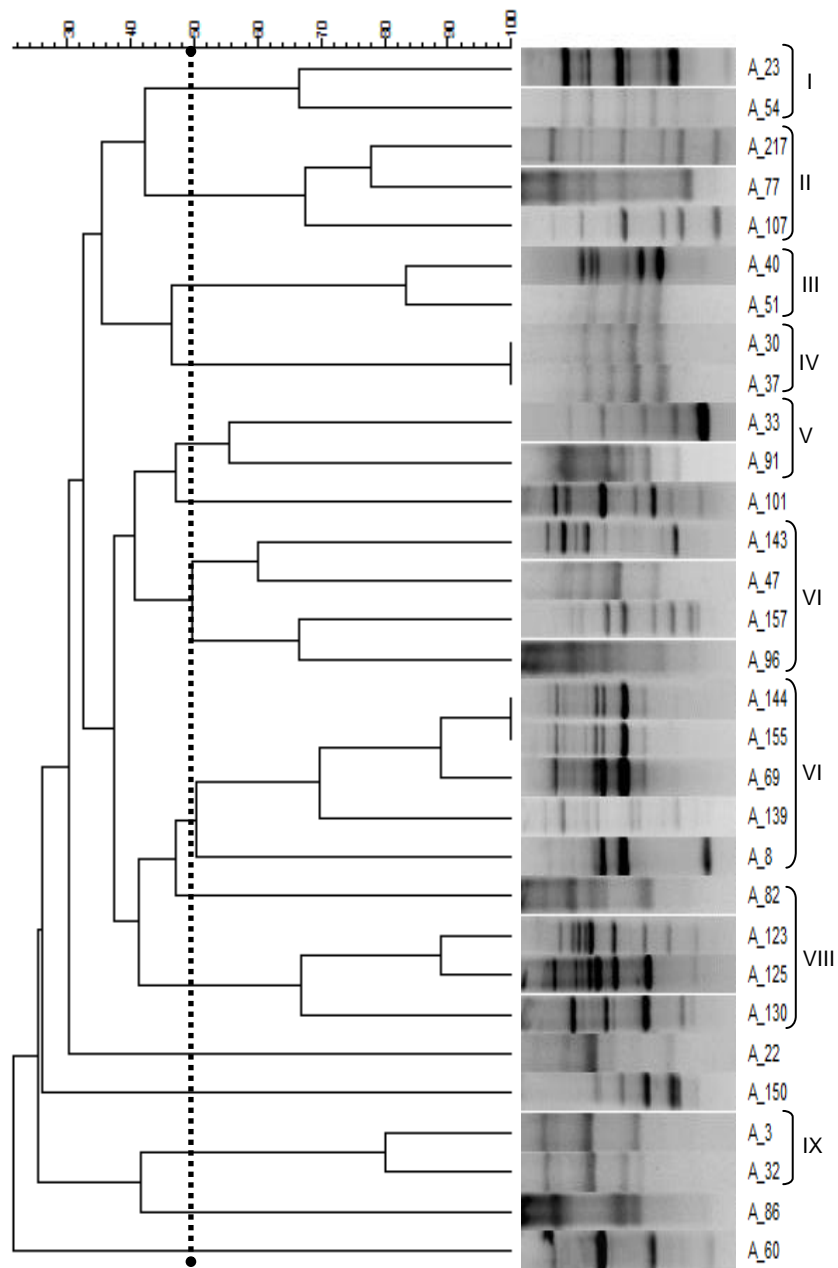


Figura 10. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de fungos filamentosos isolados de solo de Cerrado, com o iniciador GTG₍₅₎.

A genotipagem permitiu inferir o perfil genético da população de fungos em cada área que revelou alta variabilidade de perfis de bandejamento entre os isolados.

Tal variabilidade genética pode ser atribuída às diferenças inter e intraespecíficas dos isolados obtidos, visto que fungos da mesma espécie também podem apresentar padrões de bandas distintos, devido ao polimorfismo identificado por meio da técnica. Segundo Martins

(2011), a formação de um número razoável de grupos em um dendrograma demonstra a existência da variabilidade genética entre os acessos avaliados, uma vez que a formação de poucos grupos representa uma distância genética baixa.

Além disso, esta técnica permite a comparação dos fungos visando, por um lado, obter uma forma rápida, barata, reproduzível e eficiente de caracterização dos isolados da CMMF da Embrapa Milho e Sorgo e por outro, selecionar isolados para serem sequenciados. Borba et al. (2005) relataram que esta técnica pode ser utilizada para diferenciar indivíduos aparentados rapidamente, pela evidenciação do alto polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo.

Berg et al. (2005) utilizaram a técnica de BOX-PCR para diminuir a quantidade de isolados a serem sequenciados, uma vez que esta técnica, assim como o ISSR tem poder discriminatório para diferenciar linhagens e espécies. No entanto, técnicas baseadas em análise de polimorfismo podem gerar perfis diferentes para membros de uma mesma espécie, evidenciando diferenças genéticas naquela população (Gadanhó et al., 2003). Segundo Shahid (2014), produtos de diferentes loci que apresentem pesos moleculares semelhantes podem ser indistinguíveis em um gel, em razão da co-migração. As dúvidas relacionadas a homologia tornam-se maiores em níveis taxonômicos superiores, onde há maior probabilidade de ocorrer coincidência na posição de bandas por co-migração e não por similaridade genética.

Após a identificação molecular dos isolados, foi observado que o método não foi discriminatório suficiente para diferenciar espécies de grupos distintos, visto que em alguns casos gêneros diferentes agruparam em clados com maior similaridade do que espécies pertencentes a um mesmo gênero. Estes resultados concordam com os encontrados por Oliveira (2011), que utilizou a técnica de genotipagem com os iniciadores M13 e [HVH(GACA)₄] para identificação de fungos filamentosos em cortiça e observou que em grupos de isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* o método não foi discriminativo para diferenciar espécies. Neste trabalho *Penicillium Glabrum* e *Penicillium glandicula*, por exemplo, foram agrupados no mesmo cluster. Os autores sugerem que em casos como este, é recomendável utilizar dois ou mais métodos de genotipagem em conjunto.

Apesar desta técnica ser muito utilizada em estudos de distinção de isolados da mesma espécie, Meyer et al. (1991) analisaram 11 isolados de fungos filamentosos pertencentes às espécies *Penicillium janthinellum*, *P. citrioviridae*, *P. chrysogenum*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma harzianum* utilizando os oligonucleotídeos (CT)₈, (GTG)₅ e

(GACA)₄ e M13. Os autores verificaram que não houve similaridade entre os perfis dos isolados de gêneros distintos. Estes resultados não concordam com os encontrados no presente trabalho. Uma das razões seria pelo número reduzido de isolados analisados por esses autores quando comparados aos avaliados neste estudo. Com o aumento do número de isolados de diferentes gêneros e diferentes locais, supõe-se que as chances de maior dissimilaridade genética sejam encontradas.

Embora esta técnica apresente limitações, como qualquer método, Meyer et al. (1991) conclui que o DNA fingerprinting é um método eficiente para diferenciação de espécies e estirpes de fungos filamentosos. Assim como vários trabalhos apontam que este método é um dos mais poderosos para estudos de variabilidade genética em plantas, bactérias e fungos (Reddy et al., 2002; Kumar et al., 2007; Consolo et al., 2012). Neste sentido, o presente estudo reforça o valor desta técnica para caracterização da diversidade genética de fungos e realça a necessidade e importância da combinação do método a outros dados/técnicas para identificação taxonômica de fungos filamentosos.

Entretanto, como o protocolo de coleta e isolamento dos fungos não atendeu aos requisitos básicos para análise de índices ecológicos e de diversidade, não foi possível uma abordagem comparativa entre as áreas através de ferramentas ecológicas. Dessa forma, as afirmativas sobre comparações entre habitats demonstram tendências que teriam que ser comprovadas em um novo inventário à campo.

4.2. Caracterização Filogenética de Fungos Filamentosos por Sequenciamento da Região ITS do rDNA

A região ITS do rDNA foi sequenciada para melhor caracterização da diversidade e para identificação e diferenciação dos isolados das áreas estudadas. A partir da utilização dos iniciadores ITS1F X ITS4 o produto amplificado da região ITS gerou um fragmento de aproximadamente 650 pb para todos os isolados (Figura 11)

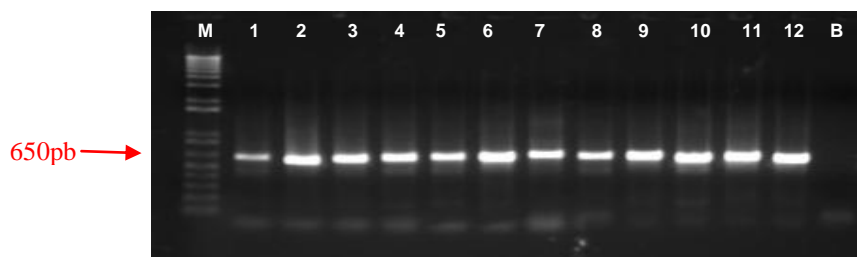


Figura 11. Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose a 1% de isolados de fungos filamentosos, usando os primers ITS1F e ITS4. Marcador de peso molecular: 1kb Invitrogen Plus.

Este resultado concorda com os de outros autores que encontraram fragmentos que variam em torno de 550 a 700 pb para a região ITS-5.8S-ITS2, dependendo do iniciador e do isolado analisado (Menezes et al., 2010).

No total foram sequenciados 121 isolados, mas apenas as sequências que apresentaram >96% de Identidade e *e-value* igual a zero foram selecionadas. Dessa forma analisou-se 107 isolados (Tabela 3). O sequenciamento da região ITS foi eficaz para identificação da maioria das espécies, sendo que 83% dos resultados da análise BLAST apresentaram homologia 100% com relação às sequências depositadas no GenBank.

Tabela 3. Identificação de 107 isolados de fungos filamentosos por sequenciamento da região ITS do rDNA pela ferramenta BLASTN em comparação com o material encontrado no GenBank.

Identificação do isolado (CMSV)	Local de isolamento	Identidade (%)	Número de acesso no GenBank	Resultado BLASTN
358	Cg	100	FJ478106.1	<i>Aspergillus carneus</i>
952	Eu	99	HQ608146.1	<i>Aspergillus cervinus</i>
891	Eu	99	KP068688.1	<i>Aspergillus flavipes</i>
200	Cg	99	KR023997.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>
623	Ma	99	HQ285542.1	<i>Aspergillus oryzae</i>
269, 228	Cg, Eu	100	AY373863.1	<i>Aspergillus puniceus</i>
359, 932	Ma, Cp	96, 99	JF312217.1	<i>Aspergillus sp.</i>
212	Eu	100	HM535365.1	<i>Aspergillus sp.</i>
208	Ma	100	HM535375.1	<i>Aspergillus sp.</i>
627	Ma	100	AM883159.1	<i>Aspergillus sydowii</i>
857	Cg	100	FJ008988.1	<i>Aspergillus sydowii</i>
358	Cg	100	GU232767.1	<i>Aspergillus versicolor</i>
886	Cp	100	EU552110.1	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>
432	Ce	100	JX545200.1	<i>Uncultured Bionectria</i>
521	Ce	100	AF437777.1	<i>Fungal isolate wood</i>
196	Cg	100	FJ612963.1	<i>Fungo sp.</i>
32	Ma	100	JX456830.1	<i>Fungo uncultured</i>
960	Cp	100	FN391303.1	<i>Fungo uncultured</i>
29	Ce	100	KM246758.1	<i>Gongronella butleri</i>
984	Ma	100	AB855778.1	<i>Mariannaea elegans</i>
1003	Cg	99	KR265332.1	<i>Mycosphaerella sp.</i>
218, 733, 816, 834	Ma, Ca, Eu, Cg	100	FN650655.1	<i>Mucor fragilis</i>

607, 829, 840	Ma, Ma, Ce	100	JQ972063.1	<i>Mucor fragilis</i>
865	Eu	100	FJ765030.1	<i>Ophiocordyceps heteropoda</i>
199	Cg	100	GQ414523.1	<i>Paecilomyces tenuis</i>
696, 982	Cg, Ce	100	AB455514.2	<i>Penicillium brasilianum</i>
770	Cp	100	JQ781748.1	<i>Penicillium brasilianum</i>
871	Ce	100	KF624802.1	<i>Penicillium cairnsense</i>
36, 669	Eu, Ma	100	NR_121508.1	<i>Penicillium cairnsense</i>
723, 361, 888, 774	Cg, Cp, Ce, Cp	100	KM491892.1	<i>Penicillium citrinum</i>
438	Ce	100	GU566273.1	<i>Penicillium citrinum</i>
955	Cg	100	JQ776541.1	<i>Penicillium daleae</i>
67	Ma	100	JN180489.1	<i>Penicillium glabrum</i>
1000, 954	Cg	100, 98	AF033418.1	<i>Penicillium hirayamae</i>
894	Eu	100	GU981569.1	<i>Penicillium penarojense</i>
949	Cg	100	AB872825.1	<i>Penicillium purpurogenus</i>
951	Cg	100	HQ608123.1	<i>Penicillium purpurogenus</i>
895, 1001	Eu, Cg	99, 98	HM469430.1	<i>Penicillium simplicissimum</i>
161, 930, 78	Ce, Eu, Eu	97, 97, 98	KF359583.1	<i>Penicillium simplicissimum</i>
947	Cg	100	KJ439103.1	<i>Penicillium simplicissimum</i>
959	Cp	99	HQ607998	<i>Penicillium simplicissimum</i>
922, 220	Cg, Eu	98, 96	JN798529.1	<i>Penicillium sp.</i>
866	Cp	99	KF679360.1	<i>Penicillium sp.</i>
209, 1004, 756	Cg, Ce, Ce	100	HQ631040.1	<i>Penicillium sp.</i>
958	Cp	100	KM099503.1	<i>Penicillium sp.</i>
909, 943	Cg, Cg	100	KR154944.1	<i>Penicillium sp.</i>
250, 202, 920	Ce, Eu, Cp	100	GU566206.1	<i>Penicillium sp.</i>
296	Eu	99%	HQ608066.1	<i>Penicillium sp.</i>
798	Ce	96%	JF439498.1	<i>Penicillium sp.</i>

270, 363	Cg, Ce	100, 99	KF225854.1	<i>Uncultured Penicillium</i>
975	Ma	99	GU055994.1	<i>Uncultured Penicillium</i>
60, 150	Ma, Eu	98, 90	KP132690.1	<i>Scedosporium boydii</i>
934	Ma	100	KM461120.1	<i>Scedosporium boydii</i>
793	Ce	100	KT336515.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
771	Ma	100	HM176559.1	<i>Trichoderma gamsii</i>
912	Cg	100	HF569179.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
935	Cg	100	KR868336.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
854, 879, 870	Cg, Cp, Eu	100	KR856225.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
965, 966, 844	Ce, Cp, Ma	100	KR995121.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
967	Ma	100	EF191303.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
832	Cg	100	EU280079.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
850, 887, 502, 849	Cg, Ma, Cg, Cp	100	KJ652467.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
862	Cp	100	EU718083.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
863	Cp	100	KP898755.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
84, 662	Ma, Ce	100	GU056003.1	<i>Uncultured Trichoderma</i>
814	Ma	100	KF225918.1	<i>Uncultured Trichoderma</i>
769, 897, 222	Ma, Ce, Cg	100	KF225794.1	<i>Uncultured Trichoderma</i>
695	Cp	100	KF367543.1	<i>Trichoderma sp.</i>
861	Cp	100	KJ817327.1	<i>Trichoderma sp.</i>
847	Cg	100	NR_077177.1	<i>Trichoderma spirale</i>
953	Eu	100	HQ607861.1	<i>Trichoderma spirale</i>
728	Eu	100	KC581161.1	<i>Trichoderma spirale</i>
144	Cg	100	KM017728.1	<i>Umbelopsis isabellina</i>

Ma: Mata, Ce: Cerrado, Cg: Canga, Eu: Eucalipto, Cp: Capim.

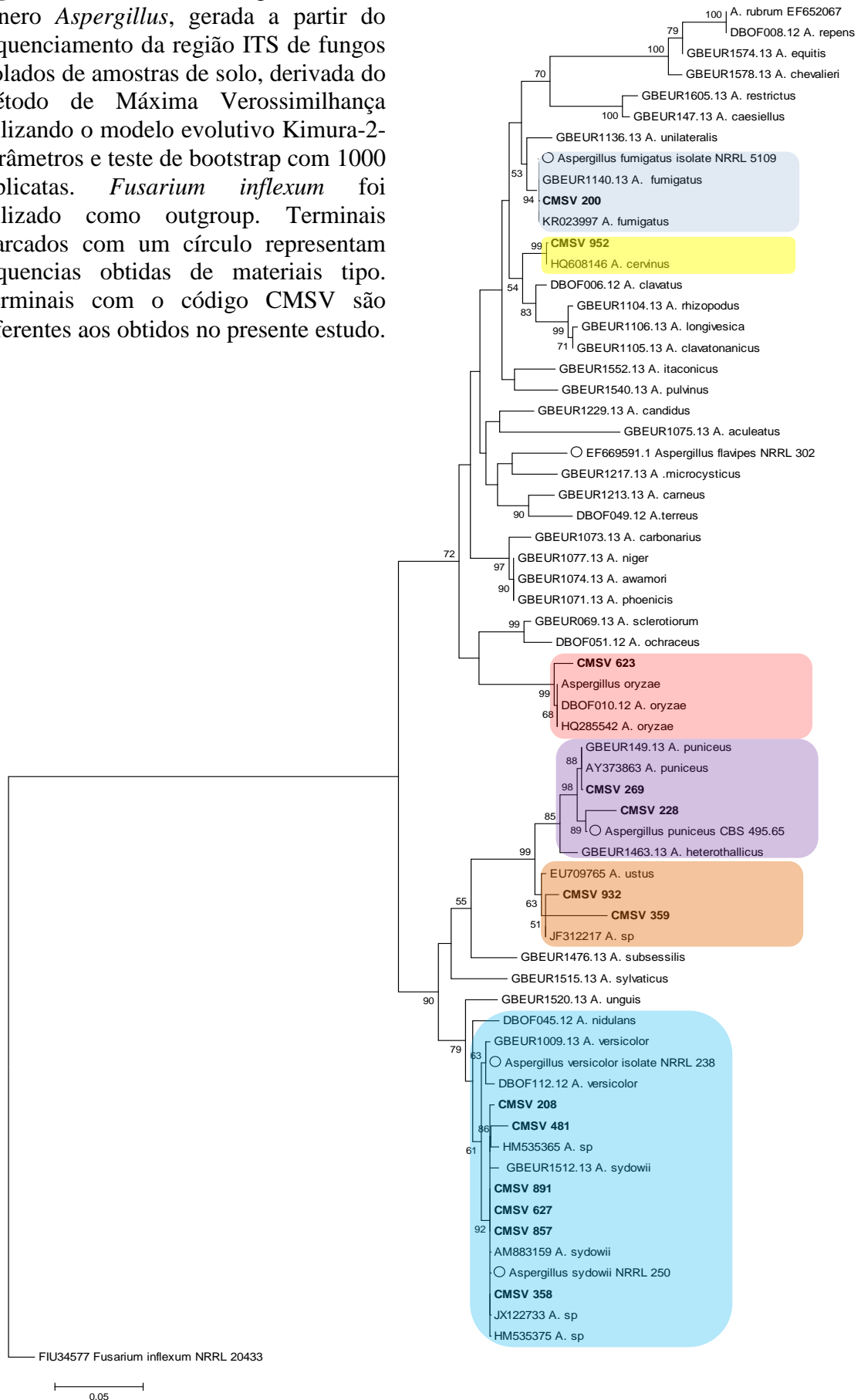
As reconstruções filogenéticas foram realizadas para os isolados identificados nos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* por serem os mais abundantes no trabalho. Estas foram feitas baseadas nas sequências geradas pelo sequenciamento da região ITS do rDNA. De acordo com as árvores geradas pelo método de máxima verossimilhança, de forma geral, observou-se concordância com os dados encontrados no sequenciamento, onde a maioria das sequências identificadas por homologia a uma determinada espécie no banco de dados do GenBank foram relacionadas à espécie TIPO e as de referência.

A Figura 12 apresenta a árvore filogenética gerada para os isolados do gênero *Aspergillus*. Apesar do baixo bootstrap nos ramos principais, os isolados identificados pela ferramenta BLAST N como *A. fumigatus*, *A. cervinus*, *A. oryzae*, *A. puniceus* formaram ramos consistentes (bootstraps acima de 93%) juntamente com as espécies tipo e as de referência.

Duas espécies identificadas somente ao nível de gênero (CMSV 932 e 359) foram filogeneticamente relacionadas à *A. ustus* em um ramo suportado com valor de bootstrap de 63%.

O grupo formado por isolados identificados como *A. sidowii* suportado com índice de 79% de bootstrap agrupou também dois isolados identificados somente ao nível de gênero (CMSV 212 e 208). Porém um isolado identificado como *A. versicolor* foi relacionado neste mesmo ramo. Segundo Jurjevic et al. (2012), *A. sidowii* e *A. versicolor* fazem parte de uma mesma seção, e por isso podem estar relacionados. No entanto, para este isolado e outros, o qual não se chegou ao nível de espécie é sugerido o uso regiões gênicas adicionais para se chegar a resultados conclusivos.

Figura 12. Árvore Filogenética do gênero *Aspergillus*, gerada a partir do sequenciamento da região ITS de fungos isolados de amostras de solo, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. *Fusarium inflexum* foi utilizado como outgroup. Terminais marcados com um círculo representam sequencias obtidas de materiais tipo. Terminais com o código CMSV são referentes aos obtidos no presente estudo.

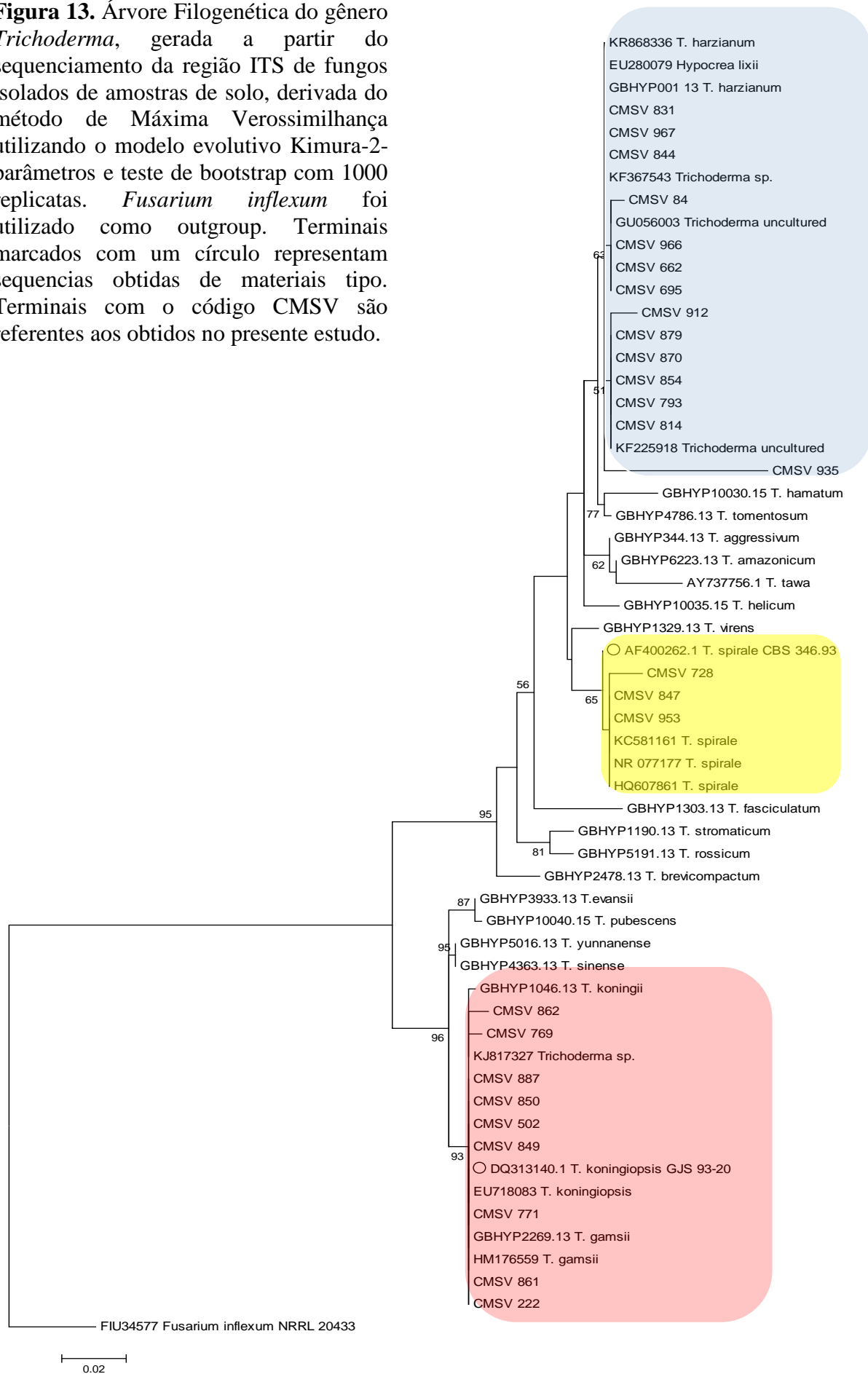


A Figura 13 apresenta as relações filogenéticas para os isolados de *Trichoderma*. Nota-se a formação de um grande grupo formado por 10 isolados identificados como *T. harzianum*, (CMSV 912, 793, 832, 967, 844, 879, 935, 870, 966, 854). Neste clado também foram relacionados dois isolados identificados como *Trichoderma uncultured* (CMSV 662 e 814) e *Trichoderma. sp* (CMSV 695) em um ramo suportado com 65% de bootstrap.

Os isolados CMSV 728, 847 e 953, identificados como *T. spirale* formaram um grupo bem resolvido, e bem suportado pela análise de bootstrap (65%).

No clado *Koningiopsis* foi observado uma politomia formada pelos seis isolados identificados como *T. koningiopsis* (CMSV 863, 862, 502, 887, 850, 849), *T. gamsii* (CMSV 771), *Trichoderma sp.* (CMSV 861) e *Trichoderma uncultured* (CMSV 769 e 222). Apesar de bem suportado com um índice de bootstrap de 95%, a formação deste clado indica a necessidade de incluir outro marcador molecular para melhor separação destas espécies.

Figura 13. Árvore Filogenética do gênero *Trichoderma*, gerada a partir do sequenciamento da região ITS de fungos isolados de amostras de solo, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. *Fusarium inflexum* foi utilizado como outgroup. Terminais marcados com um círculo representam sequencias obtidas de materiais tipo. Terminais com o código CMSV são referentes aos obtidos no presente estudo.

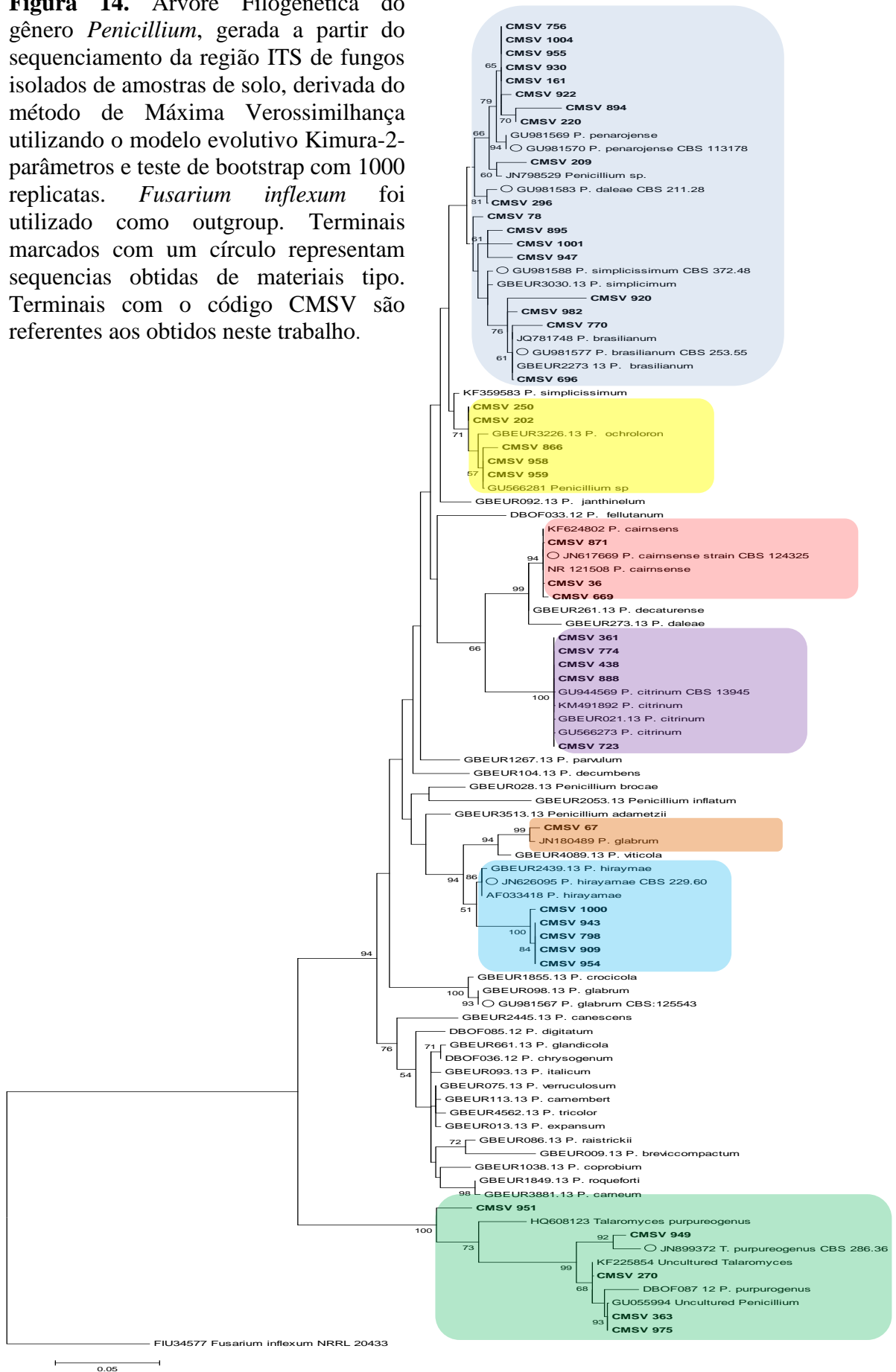


A árvore obtida pelo Método de Verossimilhança para os isolados de *Penicillium* é apresentada na Figura 14. Os fungos agrupados pelos isolados relacionados a *P. simplicimum* formaram uma politomia em um ramo com valores de bootstrap abaixo de 50%. A partir de um subgrupo suportado com 76% foram agrupados com a espécie tipo e as de referência os isolados identificados como *P. brasiliense* (CMSV 696, 770, 982) e *Penicillium sp.* (920). Conforme classificação proposta por Visagie et al. (2014) as espécies *P. penajorensis*, *P. daleae*, *P. simplicimum*, *P. brasilianum* e *P. ochroloron* estão incluídas em uma mesma seção (Lanata-Divaricata & Stolckiae).

Os isolados identificados como *P. cairnsense*, *P. citrinum* e *P. glabrum* formaram ramos bastante consistentes, com 94%, 100% e 99% de bootstrap respectivamente. Enquanto os isolados CMSV 798, 909 e 954 identificados com *Penicillium sp.* foram relacionados com *P. hiraymae* (51%).

Em outro grupo fortemente sustentado (bootstrap=100%) os isolados CMSV 949, 270, 363, 975 foram relacionados à *P. purpurogenous* e *Penicillium uncultured*.

Figura 14. Árvore Filogenética do gênero *Penicillium*, gerada a partir do sequenciamento da região ITS de fungos isolados de amostras de solo, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. *Fusarium inflexum* foi utilizado como outgroup. Terminais marcados com um círculo representam sequencias obtidas de materiais tipo. Terminais com o código CMSV são referentes aos obtidos neste trabalho.



A politomia observada em alguns ramos pode ser explicada, segundo Samuels (1996), pela alta conservação da região ITS, que, em alguns casos não discrimina espécies muito próximas em sua análise comparativa. A fim de complementar as informações genéticas atualmente são utilizados o sequenciamento de outros genes mais informativos para a classificação de fungos como o fator de alongação EF1 (“translation-elongation”), a calmodulina, β -tubulina, e a subunidade II da RNA polimerase (*rpb2*), isoladamente ou concatenada nos estudos filogenéticos.

Apesar disso, o sequenciamento da região ITS é ainda predominante em vários estudos de filogenia e taxonomia e considerado bastante útil para critérios de identificação (Porter & Golding, 2011; Nilsson et al., 2008). A facilidade de amplificação e a probabilidade de sucesso na identificação para uma variedade de grupos de fungos, bem como ao pequeno número de sequências (550 – 700pb) e elevada variabilidade fez com que essa região fosse proposta como a região BARCODE padrão para fungos (Nilsson et al., 2008; Schoch et al., 2012).

Vale ressaltar que a confiabilidade taxonômica nos bancos de dados públicos ainda é considerada menor do que o ideal (Nilsson et al., 2008). A análise de sequências fúngicas utilizando a ferramenta BLAST N possibilita a verificação da identidade das sequências em relação a sequências homólogas depositadas no banco de dados do GenBank. Essa é uma ferramenta prática do ponto de vista operacional, em razão da rapidez e facilidade de interpretação dos resultados. O alinhamento par a par empregado pelo mecanismo de busca da ferramenta BLAST é preciso. Contudo, a confiança nos resultados de identificação obtidos pela ferramenta BLAST N requerem cautela, porque, não existe um sistema de curadoria das sequências depositadas. Além disso, a inexistência de um sistema de atualização das sequências submetidas pode vir a gerar controvérsias futuras.

Por este motivo, atualmente, iniciativas como, por exemplo, a do projeto Barcode of Live Data System (BOLD) (<http://www.boldsystems.org/>) têm sido desenvolvidas para cobrir esta lacuna. Isso pode ser crítico para espécies próximas como, por exemplo, o isolado CMSV 358 *A. versicolor*, agrupado com *A. sidowii* (Figura 12). Neste sentido, a reconstrução filogenética realizada no presente trabalho incluiu sequências de espécies TIPO quando disponíveis.

A identificação de sequências fúngicas tem outro fator historicamente importante. Sequências têm sido depositadas tanto com o nome do fungo na fase anamórfica, como na

telemórfica, resultando assim, em nomes de gêneros e espécies distintas (Taylor, 2011). Atualmente existe a tendência de utilizar somente um único nome para cada fungo independentemente da sua fase reprodutiva (Taylor, 2011). Assim, no presente estudo foi considerado apenas um nome para classificação dos fungos, o nome mais usual, por exemplo, *Trichoderma* em vez de *Hypocrea* seu telemorfo.

Considerando as cinco áreas de coleta, foram identificados 107 isolados de fungos filamentosos, pertencentes a 11 gêneros, sendo oito representantes do filo Ascomycota. Três do filo Zigomycota e ainda um grupo de fungos não cultivados (Tabela 4). Dos 11 gêneros, sete deles ocorreram na área de Canga, cinco em Capim e seis em Cerrado, Mata e Eucalipto.

Tabela 4. Frequência relativa de fungos filamentosos isolados de área minerada e de preservação com base homologia por BLAST N para sequências da região ITS do rDNA obtidas.

Filo / Gênero	Área				
	Canga (%)	Capim (%)	Mata (%)	Cerrado (%)	Eucalipto (%)
Ascomycetes					
<i>Penicillium</i>	45,2	42,1	14,3	55,6	44,4
<i>Trichoderma</i>	25,8	36,8	33,3	22,2	16,7
<i>Aspergillus</i>	12,9	5,3	19,0	0,0	22,2
<i>Scedosporium</i>	0,0	0,0	9,5	0,0	5,6
<i>Paecilomyces</i>	3,2	0,0	4,8	0,0	0,0
<i>Mycosphaerella</i>	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Bionectria</i>	0,0	5,3	0,0	5,6	0,0
<i>Ophyocordps</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6
Total	90,3	89,5	80,9	83,3	94,4
Zigomycetes					
<i>Mucor</i>	3,2	5,3	14,3	5,6	5,6
<i>Umbelopsis</i>	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Gongronella</i>	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0
Total	6,4	5,3	14,3	11,1	5,6
Fungo uncultured	3,2	5,3	4,8	5,6	0,0

Os Zigomycetos foram representados por três gêneros (Tabela 4). O gênero *Mucor* foi encontrado em todas as áreas, sendo em Mata sua maior ocorrência dentre os isolados estudados. *Umbelopsis* ocorreu somente em Canga e *Gongronela* em Cerrado.

Entre os Ascomycetos o gênero *Penicillium* foi predominante entre os isolados obtidos das áreas de Canga, Capim, Cerrado e Eucalipto, seguido do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*, este último exceto para Cerrado. Em Mata, o gênero mais observado foi *Trichoderma*, seguido de *Penicillium* e *Aspergillus*. Os outros gêneros ocorreram em menor

abundância. *Paecilomyces* e *Mycosphaerella* só ocorreram em Canga, *Scedosporium* e *Paecilomyces* em Mata, *Bionectria* em Capim e Cerrado, *Ophycorcedps* e *Scedosporium* em Eucalipto.

Em todas as áreas foram reportadas sequências que apresentaram homologia com fungos não cultiváveis, sendo possível que estes fungos representem espécies ainda não identificadas. Por outro lado, nem todas as espécies identificadas apresentam sequências depositadas no GenBank, assim, uma análise criteriosa tanto da morfologia como também sequências de outros genes é fundamental para esclarecer a identidade desses isolados.

Os ascomicetos são cosmopolitas nos ecossistemas terrestres, podem ser saprofíticos, parasitas ou simbiontes. São importantes componentes da microbiota do solo e normalmente exibem alta produção de esporos, sendo normalmente mais facilmente isoladas e identificadas (Maia et al., 2006). Segundo Dix & Webster (1995), as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são dominantes em estudos nos quais o solo é utilizado como substrato.

Os principais gêneros encontrados no presente estudo são referidos como micro-organismos do solo, envolvidos na decomposição da matéria orgânica ou ação antagonista a patógenos, como *Penicillium* e *Trichoderma* (Domsch et al., 1993).

A predominância de *Penicillium* e *Trichoderma* pode estar relacionada à sua ação antagonista sobre outros fungos, através de competição nutricional e alta produção de metabólitos secundários (Gomez et al., 2007). Determinadas técnicas de isolamento podem favorecer alguns grupos de fungos através das condições nutricionais o qual são submetidos ou pela alta produção de esporos exibida por estes micro-organismos. Segundo Costa et al. (2012) a produção de diferentes estruturas como conídios, clamidósporos e ou/escleródios exibidas por fungos dos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* podem beneficiar o isolamento destes fungos em amostras de solo.

A vegetação peculiar de cada área pode influenciar a comunidade fúngica através da disponibilidade, quantidade e qualidade da matéria orgânica para nutrição da microbiota e da composição físico-química dos exsudatos presentes na região rizosférica (Grithkan et al., 2006).

Pesquisas realizadas em florestas tropicais relatam que na maioria dos casos os fungos isolados pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, entre outros (Maia et al., 2006; Pfening & Abreu, 2006). Bills & Polishook (1994) ao estudarem diversidade e riqueza de fungos em serrapilheira e florestas úmidas na

costa rica, encontraram os maiores números de isolados para os gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Mucorales* e *Pestalotiopsis*.

Aparentemente, não foi observada diminuição da ocorrência de espécies nas áreas onde ocorreram práticas de mineração ou na floresta antrópica. Estes dados diferem de alguns trabalhos encontrados na literatura. Costa (2012) ressalta que a diversidade de fungos pode ser afetada negativamente em solos degradados ou monoculturas quando comparados aos ecossistemas naturais. Trindade et al. (2000) avaliaram o estado de degradação e, ou recuperação de uma área de mineração de ferro no município de Mariana (MG) por meio da avaliação atividade microbiana, número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e população total de fungos e bactérias. Os autores compararam diferentes solos ou substratos resultantes das operações de lavra, e uma área de Mata secundária não perturbada. Estes puderam concluir que as características microbiológicas apresentaram os maiores valores no sítio de mata secundária do que nos demais amostrados, indicando que aqueles em recuperação ainda não possuíam o mesmo equilíbrio biológico.

Segundo Aburjaile et al. (2011), as monoculturas, como as plantações de eucalipto podem atuar diminuindo a diversidade de espécies através da redução de diversas fontes de matéria orgânica e acúmulo de substâncias oleaginosas presentes nas folhas de eucalipto. Santos et al. (1998) estudaram a diversidade de fungos filamentosos sobre floresta de eucalipto e encontraram resultado semelhante aos obtidos no presente trabalho quanto à ocorrência e predominância de *Penicillium* e *Trichoderma* nessas áreas. Ainda, foi observado na área minerada revegetada com Capim também o predomínio destes dois grupos de fungos. Segundo Costa et al. (2012) os ambientes perturbados favorecem a diversidade e dominância de determinados grupos que podem caracterizar-se espécies generalistas ou especialistas.

Alguns trabalhos relatam que a diminuição da diversidade de espécies no solo decresce com a redução de comunidades vegetais (Knops et al., 2002; Okoth et al., 2007). Por outro lado, Carvalho (2008) propõe que nos ecossistemas brasileiros parâmetros como a quantidade de matéria orgânica e nutrientes presentes no solo podem ser mais determinantes para a comunidade fúngica do que a flora local, visto que a maioria dos estudos que comprovam esta relação são relativamente abundantes em regiões temperadas e incipientes em regiões tropicais.

4.3. Potencial Biotecnológico dos Fungos Filamentosos

Várias espécies identificadas neste trabalho foram descritas com alto potencial biotecnológico, utilizadas na indústria química, farmacêutica e alimentícia, bem como em processos de biorremediação e controle biológico. A seguir são apresentados alguns exemplos que descrevem algumas propriedades e metabólitos isolados de alguns fungos encontrados neste estudo.

O filo Zigomycetes é considerado de grande importância nos processos biotecnológicos. Vários representantes apresentam capacidade de produzir metabólitos secundários e produtos industriais. *Umbelopsis isabelina* é muito utilizado na produção de lipídios (Takeda et al., 2014) enquanto isolados de *Gongronella butleri* foram descritos com alto potencial de produção de quitosana (Tan et al., 1996). Huang et al. (2014) obtiveram altos rendimentos de podofilotoxina (antitumoral e antiviral) a partir de *Mucor fragilis*. Esta espécie também foi descrita como um importante produtor de ácido linoleico (Song et al., 1990).

Fungos reportados como patógeno humano como *Scedosporium boydii*, também foram encontrados neste estudo. Este Ascomiceto pode causar infecções em vários órgãos do corpo humano (Gilgado et al., 2005). Esta espécie demonstrou potencial como biorremediador, na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (April et al., 1998) e produção de substâncias antifúngicas (Ko et al., 2010). *Paecilomyces tenuis* também é conhecido por causar infecções em humanos e animais, porém na maioria dos casos, quando estes estão imunodeficientes. Este fungo foi reportado por Su & Yang (2015) como produtor de Huperzina A, uma substância utilizada para tratamento de Alzheimer.

Fungos endoparasitas também foram encontrados, como a espécie *Ophiocordyceps heteropoda*, que se desenvolve em larvas de cigarra. Esta espécie considerada relativamente rara foi descrita pela primeira vez no Japão e é relatada principalmente em países do Leste asiático (Sung et al., 2011). Um representante do gênero de fungos fitopatogênicos *Mycosphaerella* foi outro fungo encontrado. Este gênero é conhecido por ser agente causal de moléstias em várias culturas economicamente importantes (Crous, 2009).

Várias espécies de *Trichoderma* foram identificadas neste estudo. Este gênero saprofítico é frequentemente isolado de diversos substratos (Druzhininal et al., 2011). Na agricultura, a aplicação deste grupo de fungos é extensa. Os *Trichoderma* apresentam grande importância econômica por estarem relacionados com o controle biológico de patógenos em

várias culturas como, por exemplo, *Botrytis cinerea* (Harman, 2000), *Sclerotinia sclerotiorum* (Inbar et al., 1996), *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* (Calistru et al., 1997).

Cerca de 100 substâncias produzidas por estes fungos são conhecidas por possuírem atividade antibiótica, incluindo poliquetídeos, pironas, terpenos, metabólitos derivados de aminoácidos, polipeptídeos, sem contar as enzimas (Harman & Kubicek, 2002). A ação benéfica de *Trichoderma* para as plantas não se resume apenas a proteção contra patógenos. Estudos demonstram que estes podem conferir tolerância a estresses abióticos, promoção do crescimento e vigor da planta, solubilização de nutrientes e biorremediação de metais pesados e substâncias lesivas ao ambiente (Mastouri et al., 2012; Hermosa et al., 2012; Kapri & Lakshimi, 2010; Mohamed & Haggag, 2006).

Zhang et al. (2013) relataram em um estudo com estirpes de *T. koningiopsis* com alta produção de celulase e β -glucosidase. Também foram descritos na literatura como produtores de p-hidrozbencil álcool (Huang et al, 1995). *Trichoderma harzianum* além de ser a principal espécie componente dos biopesticidas comercializados foi descrita por Katayama & Matsumura (1993) como alto produtor de celulase.

Aspergillus e *Penicillium* também são considerados um dos gêneros fúngicos mais importantes economicamente. Esses gêneros pertencem a família Aspergillaceae. Os membros pertencentes desta família são importantes produtores de vários metabólitos e enzimas de importância biotecnológica (Houbraken et al., 2014).

Os fungos do gênero *Penicillium* produzem metabólitos secundários de várias classes de compostos químicos como alcaloides, diquetopiperazinas, benzodiazepinas, quinolinas, quinazolinas e poliquetídeos, conforme descrito por Kozlovsky et al. (2012) em uma excelente revisão de literatura sobre os metabólitos produzidos pelos membros deste gênero, e que também tem sido alvo de várias pesquisas em biorremediação, em razão do seu potencial de adsorção de metais pesados e degradação de hidrocarbonetos (Leitão, 2009).

Alguns metabólitos apresentam valor particular para a indústria farmacêutica a exemplo da compactina (regulador de colesterol) produzida por *P. citrinum* (Endo et al., 1976) e os antibióticos ácido B-Nitropropionico por *A. oryzae* e *A. flavus*, Nidamicina e magnamicina por *P. daleae* (Jong & Donovan, 1989) e fumagilina por *A. fumigatus* (Lamrani et al., 2008) .

Os compostos isolados de *P. citrinum* apresentam diversas funções biológicas, como ação de regulação no crescimento vegetal por meio da produção de citrinolactonas e

esclerotinina C (Kuramata et al., 2007), atividade antioxidante (Chen et al., 2002) e tratamento de alzheimer (Kim et al., 2001).

Méendes et al. (2011) avaliaram uma estirpe de *P. purpurogenum* e demonstraram que esta produz um pigmento de potencial interesse da indústria têxtil e de alimentos. Além disso, esta espécie também foi descrita como produtor extra e intracelular de frutossiltransferase (Dhake & Patil, 2007) e ainda com potencial de adsorção de metais pesados (Say et al., 2004). Bergsten-Torralba et al. (2009) relataram uma estirpe de *P. simplicimum* eficaz na descoloração diferentes corantes têxteis e na redução da sua toxicidade. Esta espécie também foi reportada por Franz et al., (1991) por sua capacidade de excreção de ácido cítrico em presença de óxidos de metal insolúveis e por Fan et al. (2008) pela capacidade adsorção de cádmio, zinco e Pb. *Aspergillus oryzae* desempenha um papel fundamental no processo de fermentação de várias bebidas tradicionais japoneses e molhos (Prakash & Jha, 2014), de biorremediação de organofosforados (Bhalerao & Puranik, 2009) e produção de β - glucosidase (Riou et al., 1998). *Penicillium brasilianum* tem sido alvo de pesquisas por sua capacidade de produção de metabólitos antimicrobianos e alelopáticos (Tang et al., 2014) e produção de celulase e xilanase (Jorgensen et al., 2003).

Em contraste, vários aspectos negativos também podem ser relacionados aos fungos desta família, especialmente em *Aspergillus* são várias as espécies patógenos oportunistas de plantas e animais, como *A. fumigatus*, *A. flavus* que podem causar aspergillose bronquiopulmonar, aspergiloma e aspergillose invasiva e *A. sidowii*, um causador comum de micose em humanos (Takahata et al., 2008). Espécies destes grupos também promovem a contaminação de produtos agrícolas em diferentes fases e produzem grandes quantidades metabólitos secundários tóxicos, como as micotoxinas: Ocratoxina, pantulina, citritinina, citrioviridina e aflatoxina (Pitt, 2000; Perrone et al., 2007; Houbraeken et al., 2014).

Dessa forma, tais informações juntamente a outras disponíveis na literatura, vêm incrementar o conhecimento do potencial dos fungos que compõem a coleção de micro-organismos multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, e podem ser utilizadas como estratégia para uma futura prospecção direcionada, além do fornecimento de informações que agregam valor a coleção.

4.4. Estimativa da Diversidade Genética de *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* com Marcador ISSR GTG₅

A amplificação do DNA dos fungos utilizando o iniciador trinucleotídeo GTG₍₅₎ gerou perfis com 3 a 13 fragmentos, que variaram entre 400 e 12.000 pb. (Figura 16). Filho (2003) encontrou padrões de 9 a 19 fragmentos com peso molecular entre 450 e 1.350 pb em leveduras com o mesmo iniciador.

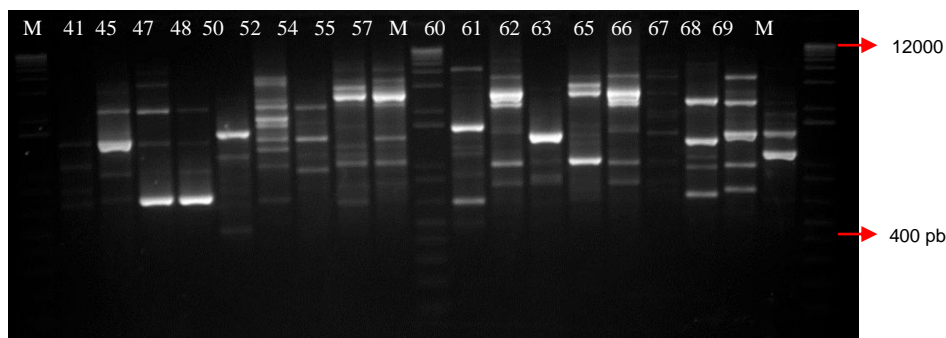


Figura 16. Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose (1,5%) de isolados de fungos filamentosos, usando o primer GTG₍₅₎. Marcador de peso molecular: 1kb Invitrogen Plus.

Os dendrogramas gerados pelo perfil de bandas em gel de agarose ilustram a variabilidade intra e interespecífica de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* oriundos de diferentes locais de coleta (Figuras 17, 18 e 19). A partir dos resultados, foi possível observar que a amplificação com o primer GTG₍₅₎, foi capaz de evidenciar o polimorfismo existente entre os isolados. Os coeficientes de similaridade gerados pelo algoritmo UPGMA variaram de 34% a 86% para os isolados de *Aspergillus*. Para *Trichoderma* o coeficiente variou entre 34% a 100% e em *Penicillium* de 46% a 100%. Estes resultados concordam com os encontrados por Meyer et al. (1997) que utilizou os primers (GACA)₄ e (GTG)₅ para identificação de espécies de *Cândida*. O referido autor indicou uma variação interespecífica nos perfis em torno de 20%, em relação a variação interespecífica que foi maior que 80%.

Na Figura 16 é apresentado o perfil de bandas de 12 isolados de *Aspergillus*. Ao nível de 80% de similaridade foi possível observar a formação de 2 grupos. O primeiro formado pelos isolados CMSV 359 e 932 identificados como *Aspergillus sp.* com 84% de similaridade e que também foram relacionados como espécies próximas pela análise filogenética (Figura 12). O segundo grupo foi formado pelos isolados CMSV 891 e 857 identificados como *A. sidowii* com 86% de similaridade pelo método UPGMA.

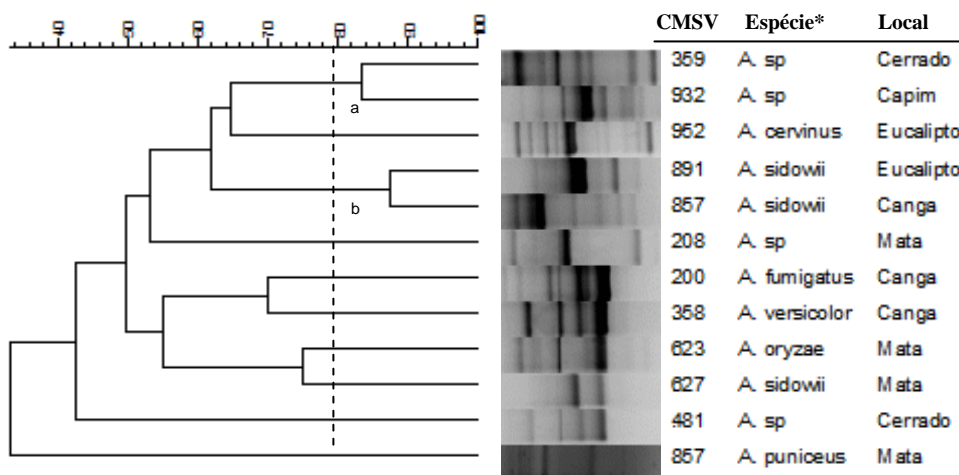


Figura 17. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de 12 isolados de *Aspergillus*, com o iniciador GTG₍₅₎. *Resultado BLASTN

O dendrograma sugere que a técnica foi eficaz em acessar a diversidade intra e interespecífica entre os isolados de *Aspergillus* e pode ser utilizada como ferramenta para distinção das espécies deste gênero. A alta variabilidade interespecífica observada pode ser atribuída ao fato dos isolados serem de diferentes regiões geográficas, e por se tratar de espécies distintas.

Na Figura 18 é exibido o dendrograma obtido através do perfil genético de 19 isolados de *Trichoderma*. Através de uma linha de corte de 80% de similaridade foram obtidos quatro grupos e dez isolados que não foram agrupados.

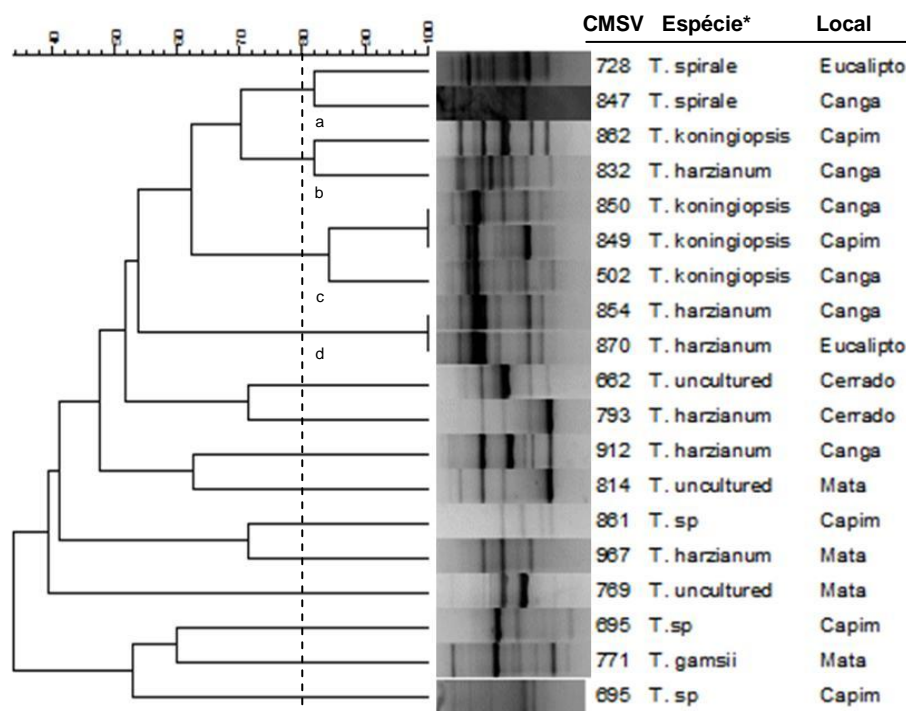


Figura 18. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de 19 isolados de *Trichoderma* com o iniciador GTG₍₅₎. *Resultado BLASTN

Os isolados CMSV 850 e 849 (*T. koningiopsis*) e 854 e 870 (*T. harzianum*) apresentaram máxima similaridade, e podem ser considerados geneticamente idênticos, mesmo sendo oriundos de locais distintos. Silva-Filho et al. (2005) sugeriram que a identificação amostras com o mesmo padrão de amplificação (número e intensidade de bandas) poderia indicar origem clonal de cepas de origem geográficas diferentes.

No grupo A, se encontram os isolados de *T. spirale*, com 82% de similaridade e o grupo B também com 82% de similaridade com os isolado CMSV 862 (*T. koningiopsis*) e 832 (*T. harzianum*). No clado C foram agrupados 850, 849, 502 ambos *T. koningiopsis*, demonstrando que a técnica também é eficaz para acessar a diversidade intraespecífica.

Assim como no presente trabalho, Consolo et al. (2012) identificaram *T. harzianum* como a espécie mais representativa do gênero em seu estudo. Observou-se a diversidade aparente fungos desta espécie foi alta, evidenciada pelos diferentes perfis genéticos. Este fato também foi relatado pelos autores supracitados. Os isolados de *T. harzianum* avaliados por eles através de ISSR foram agrupados em dois clusters principais com maior semelhança genética e outros dois isolados exibiram padrões genéticos diferentes e foram agrupados em

outro cluster com maior distância de similaridade. A partir destes resultados foi sugerido que existe uma variação genética dentro do grupo, mas ressaltam entretanto que a origem desta variação não é clara. Segundo o referido trabalho, *Trichoderma* são diploides e heterotáticos, e que diferentes estirpes são susceptíveis a uma rápida evolução e recombinação a partir das frequências e do tipo de reprodução. Além disso, outros mecanismos, como mutações, recombinações e migrações poderiam explicar a diversidade genética observada.

Kullnig et al. (2000) ao avaliarem cerca de 35 espécies de *Trichoderma* isolados da Rússia, Sibéria e Himalaia por meio de caracterização morfológica e por meio de ISSR também observaram variabilidade dentro do gênero, principalmente em *T. harzianum*. Esta espécie é considerada atípica dentro do gênero, com alta variabilidade genética. Estudos sugerem que *T. harzianum* trata-se, na verdade, de um complexo de espécies que inclui linhagens filogenéticas crípticas morfológicas e biológicas, apresentando até mesmo número de cromossomos diferentes em alguns casos (Samuels, 1996).

Em relação ao perfil genético dos 27 isolados de *Penicillium*, observou-se que ao nível de 80% de similaridade foram obtidos oito clusters e outros seis isolados que não foram agrupados (Figura 19).

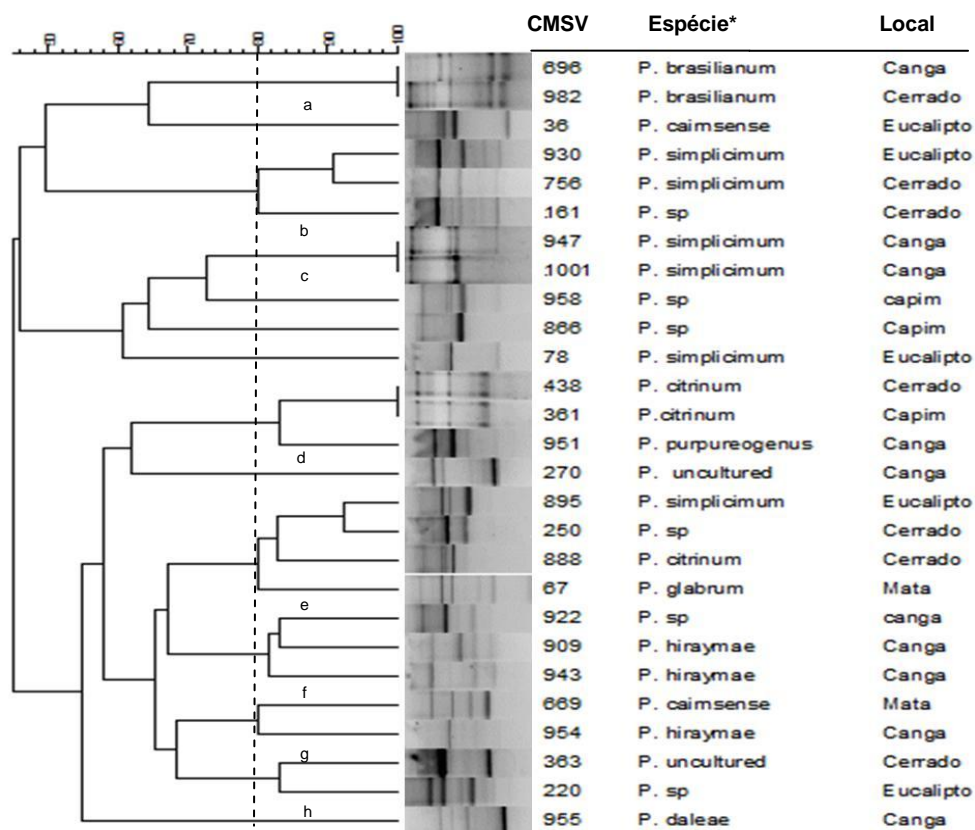


Figura 19. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de 23 isolados de *Penicillium* com o iniciador GTG₍₅₎. *Resultado BLASTN

Foram considerados geneticamente idênticos os isolados CMSV 696 e 982 (*P. brasilianum*), 947 e 1001 (*P. simplicium*) e 438 e 361 (*P. citrinum*) por apresentarem 100% de similaridade no perfil de bandas.

No clado b, foram agrupados com 90% de similaridade os isolados CMSV 930 e 756 (*P. simplicium*) e com 80% o isolado CMSV 161 (*Penicillium sp.*) relacionado no mesmo ramo na análise filogenética (Figura 13). O mesmo ocorreu no clado e, onde uma espécie de *P. simplicium* foi relacionada com 90% de similaridade com uma espécie de *Penicillium sp.* Estas espécies também foram relacionadas pelo sequenciamento da região ITS.

A comparação dos dendrogramas obtidos evidenciou que para todos os gêneros a relação entre distância genética e o local de isolamento não foi relevante, visto que houve homogeneidade genética até mesmo entre os isolados de áreas distintas. Isso demonstra que o local de isolamento parece não ter relação com o perfil genético dos isolados estudados. Neste caso, a relação entre o perfil genético e parentesco pareceu ser mais evidente. Brasileiro et al. (2004), utilizando o iniciador (GTG)₅ para a caracterização de isolados da espécie *Fusarium*

solani, também não encontraram relação entre o perfil genético dos grupos e a região geográfica e/ou substrato de onde foram isolados.

No entanto, foi observado que alguns clusters gerados pelo algoritmo UPGMA agruparam isolados com perfis genéticos semelhantes, posteriormente identificados como espécies distintas por sequenciamento de DNA, ou entre outros casos isolados pertencentes à mesma espécie, apresentaram baixo coeficiente de similaridade. Tal fato pode ser decorrente do coeficiente utilizado (Jaccard), que correlaciona presença e ausência das bandas. Dessa forma, é possível que produtos de diferentes locos que apresentem pesos moleculares semelhantes, tenham a mesma mobilidade em um gel de agarose, levando a uma identificação falso-positiva por causa da co migração (Shahid et al., 2014). Ou ainda, como observado por Castrillón (2012) pode ser em razão da baixa amplificação observada em alguns locos, ou da baixa resolução do gel de agarose, que reduz a resolução do algoritmo para diferenciar os grupos genéticos, indicando uma falsa ausência no perfil de bandas. Logo, para algumas espécies cuja amplificação não resultou em dados conclusivos, outros marcadores devem ser empregados para escolha do mais eficiente em detectar polimorfismos naquele grupo.

É importante ressaltar que o fingerprinting nem sempre é dependente da relação filogenética, visto que o sequenciamento é dado pela amplificação de uma região específica do DNA. A técnica ISSR apresenta caráter mais informativo por permitir a análise de um maior número de loci, de tal forma que essa relação pode ou não ser evidente.

De modo geral, esta técnica demonstrou-se uma ferramenta útil e complementar para a análise da variabilidade genética entre isolados de interesse e torna-se muito vantajoso no processo de conhecimento da base genética de espécies. Zhou et al. (2001) investigaram a diferenciação de espécies de *Botryosphaeria* e fungos anamórficos relacionados através de ISSR. Os autores concluíram que esta técnica pode ser uma ferramenta poderosa para diferenciar fungos filamentosos estreitamente relacionados com morfologias muito semelhantes ou de suas sequências, como acontece com os fungos de interesse agrícola e biotecnológico *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*, visto a dificuldade para identificação das espécies deste gênero.

Essa diversidade também pode contribuir com esclarecimento de diferenças observadas em morfotipos e a função biológica, como por exemplo, a correlação positiva entre a diversidade genética acessada por ISSR e o potencial antagonico de isolados de

Trichoderma avaliados por Kumar & Sharma (2011) ou a produção de aflatoxinas por isolados de *A. flavus* (Hatti et al., 2010).

Os resultados aqui encontrados reforçam a importância da utilização deste marcador molecular proporcionando dados complementares e mais precisos, quando se estuda a identificação de determinadas espécies e quando a descrição morfológica e do sequenciamento da região ITS não fornece os dados suficientes para a identificação desses isolados. Por ser considerada uma técnica rápida e reprodutível, este marcador pode ser utilizado como ferramenta auxiliar nos estudos taxonômicos. Vale salientar que esta técnica pode ser utilizada no monitoramento de possíveis alterações genéticas e caracterização dos isolados preservados em coleções de micro-organismos para controle e seleção de estirpes divergentes geneticamente para prospecção de seu potencial.

4.5. Avaliação da Capacidade de Biossolubilização de Potássio *in vitro* por Fungos Filamentosos

Os resultados da capacidade de solubilização das rochas verdete e flogopito em função dos nove isolados de fungos filamentosos testados estão apresentados na Tabela 5. Independentemente da rocha analisada observou-se diferença significativa para o teor de potássio disponível no meio de cultura em função dos isolados de fungos.

Tabela 5. Solubilização de K (mg.L⁻¹) após 14 dias de incubação em meio de cultura MISK contendo pó de rocha Flogopito e Verdete como fonte única de K.

Isolado	Potássio (mg.L ⁻¹)	
	Flogopito	Verdete
CMSV 250	n.d	0,67 a
CMSV 870	0,07 a	1,28 a
CMSV 844	0,73 a	n.d
CMSV 947	0,79 a	6,72 d
CMSV 733	0,98 a	n.d
Não inoculado	1,14 a	1,65 b
CMSV 502	1,45 a	2,49 b
CMSV 296	2,22 b	1,89 b
CMSV 200	2,85 b	0,48 a
CMSV 798	3,86 b	4,86 c

As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. n.d indica que não foi detectado.

Em relação a rocha flogopito, os teores de K solubilizado variaram de 0,07 a 3,86 mg.L⁻¹, sendo os valores mais elevados detectados na presença dos isolados CMSV 296 - *Penicillium sp* (2,22 mg.L⁻¹), CMSV 200 - *T. harzianum* (2,85 mg.L⁻¹), CMSV 798 - *Penicillium sp.* (3,86 mg.L⁻¹) após 14 dias de incubação. O teor de K solubilizado pelo isolado CMSV 798 corresponde a um incremento de 338% com relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Por outro lado, o fungo que apresentou maior capacidade de solubilização de K a partir da rocha verdete foi identificado como *P. simplicium* - CMSV 947 com a liberação de 6,72 mg.L⁻¹ de K no meio, equivalente a 407% superior em relação ao controle. Neste caso, a eficiência de solubilização oscilou entre 0,67 a 6,72 mg.L⁻¹.

Fungos solubilizadores de K a partir de diferentes rochas têm sido relatados em diversos estudos. Brandão et al. (2014) avaliaram uma estirpe de *A. niger* (CCT4355) quanto a sua capacidade de solubilizar nutrientes a partir das rochas fonolito e diabásico. Os autores observaram um aumento significativo da quantidade de K solúvel, no tratamento com pó de fonolito, na presença do fungo. Lopes-Assad et al. (2010) avaliaram dois isolados de *A. niger* quanto ao potencial de solubilização de potássio em rocha ultramáfica. As duas estirpes apresentaram capacidade de solubilização, incrementando 62% e 70% deste elemento em um período de incubação de 35 dias.

Os teores de K encontrados neste estudo assemelham-se aos encontrados por Zhang & Kong (2014) em estudos realizados com estirpes bacterianas para solubilização da rocha feldspato. Os autores encontraram 0,59 a 4,4 mg.L⁻¹ de K ao final de 7 dias de incubação. Por outro lado, os maiores valores encontrados no presente trabalho estiveram abaixo dos observados por Marriel et al. (2006). Os autores avaliaram 40 isolados fungicos e obtiveram teores de K no meio de cultura suplementado com Biotita xisto variando de 1,5 a 17,4 mg.L⁻¹ e de 3,5 a 18 mg.L⁻¹, extraídos em água e em acetato de amônio, respectivamente. Da mesma forma, Silva et al. (2015) relataram a solubilização de fonolito em meio MSK a partir de um isolado de *Aspergillus-F76*, liberando 17 mg.L⁻¹ de K. Os autores também identificaram uma estirpe de *Burkholderia sp.* que atuou liberando 38 mg.L⁻¹ em 10 dias de incubação.

A variação dos teores de K solubilizado nos diferentes trabalhos pode ser atribuída a diferentes fatores, entre eles as características mineralógicas das rochas utilizadas (Lopes-Assad et al., 2006), condições nutricionais do meio de cultura, ou ainda as próprias características intrínsecas do isolado. No entanto, o mecanismo de solubilização por micro-

organismos não é totalmente esclarecido, e são poucos os trabalhos publicados que investigam estes fatores nos processos de solubilização de K (Meena et al., 2014), principalmente com rochas de ocorrência no Brasil.

Observou-se que os valores de K encontrados para alguns isolados não diferiram estatisticamente do controle (Tabela 5). É possível que os baixos níveis observados possam ter ocorrido por causa da imobilização do nutriente por meio dos micro-organismos. Alves et al. (2010) também observaram a imobilização do K por fungos ectomicorrízicos. Os autores atribuíram este fato ao consumo do mineral presente na solução a partir da solubilização. A imobilização de nutrientes é possível, visto que os fungos podem vir a consumir os nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento a partir de superfícies minerais (Wang et al., 2000).

Não foi observado correlação entre K e pH, embora a eficiência de solubilização tenha apresentado uma associação negativa com o aumento da acidez ($r = -0,10$). Foi observado redução nos valores de pH com diferença significativa entre os isolados em relação ao tratamento não inoculado, atingindo valores de 2,63 e 2,65 para as rochas verdete e flogopito respectivamente na presença do isolado CMSV 798 (Figura 20).

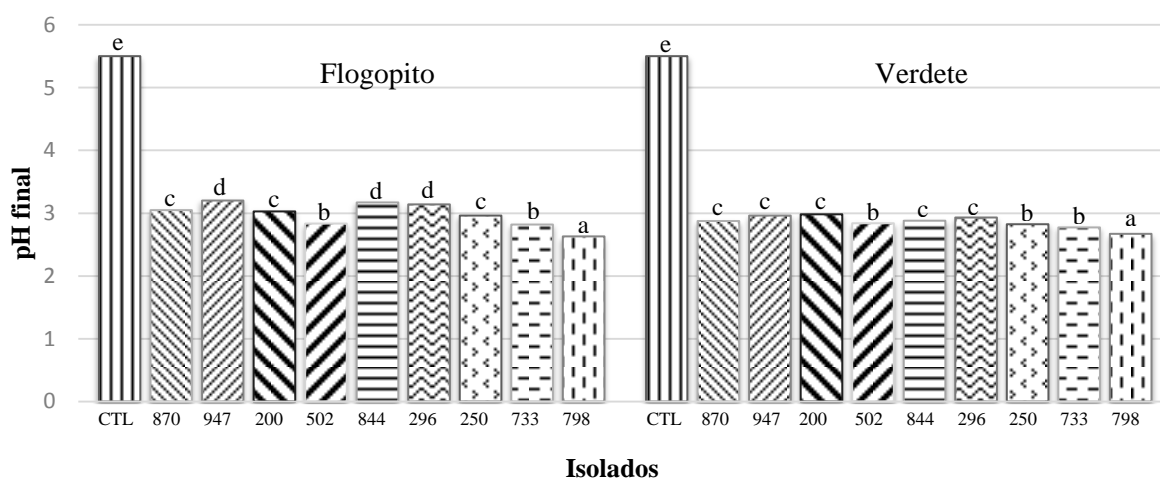


Figura 20. Variação do pH no meio de cultura após 14 dias de incubação em meio de cultura MISK contendo pó de rocha Flogopito e Verdete como única fonte de potássio. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Estes resultados concordam com os encontrados por Silva et al. (2015), que também verificaram a diminuição dos valores de pH em ensaio *in vitro* com a rocha fonolito inoculada com fungos e bactérias isoladas do solo. Em um ensaio de solubilização com um isolado de *A. niger* com rochas ultramáfica alcalina e flogopito conduzido por Lopes-Assad et al. (2006),

verificou-se alta acidificação do meio de cultura nos primeiros 7 dias, com pH 2,7 e 3,5 respectivamente. Estes valores permaneceram até o 21º dia, apresentando diminuição para a rocha flogopito (2,5) e um leve aumento para a ultramáfica alcalina (3,7). Vários trabalhos apontam que durante o processo de solubilização há um decréscimo dos valores de pH a partir da liberação de ácidos orgânicos e prótons H⁺ pelos micro-organismos (Wang et al., 2000; Parmar & Sindhu, 2013; Zarjani et al., 2013; Behera et al., 2014; Meena et al., 2014).

4.6. Produção de Ácidos Orgânicos *in vitro* por Fungos Filamentosos

A análise cromatográfica para determinação de ácidos orgânicos demonstrou o potencial de produção de ácido oxálico, cítrico e láctico exibido pelos nove isolados de fungos filamentosos analisados. De acordo com os resultados obtidos observou-se variabilidade na capacidade de produção de ácidos orgânicos pelos fungos na presença de flogopito e verdete ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Produção de ácido cítrico, láctico e oxálico por isolados de fungos filamentosos em meio MISK suplementados com pó de rocha Flogopito e Verdete.

Isolado	Ácido cítrico (mg.L ⁻¹)		Ácido láctico (mg. L ⁻¹)		Ácido oxálico (mg. L ⁻¹)	
	Flogopito	Verdete	Flogopito	Verdete	Flogopito	Verdete
CMSV 798	1664,7 a	1228,84 a	271202,8 a	386895,80 a	12,28 a	6,82 a
CMSV 733	451,86 b	112,95 c	872,19 b	228,23 b	0,64 b	0,81 b
CMSV 947	271,69 c	276,42 b	13,22 b	184,69 b	1,07 b	1,03 b
CMSV 250	259,25 c	229,4 b	31,61 b	79,79 b	0,20 b	0,23 b
CMSV 502	215,57 c	122,19 c	331,48 b	305,67 b	0,57 b	0,87 b
CMSV 296	177,46 c	249,97 b	24,04 b	61,36 b	0,24 b	0,31 b
CMSV 200	106,93 d	30,03 d	133,99 b	124,68 b	0,93 b	0,54 b
CMSV 870	34,67 d	117,73 c	54,88 b	64,29 b	0,72 b	0,94 b
CMSV 844	11,99 d	15,36 d	39,05 b	97,32 b	0,48 b	0,61 b
Controle	2,45 d	7,58 d	11,38 b	15,75 b	0,66 b	1,72 b

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No meio de cultura suplementado com a rocha flogopito as concentrações de ácido cítrico variaram entre 11,99 mg.L⁻¹ a 1.664,7 mg.L⁻¹ e em verdete 15,36 mg.L⁻¹ a 1.228,84mg.L⁻¹. Em relação ao ácido láctico estes valores variaram de 13,22 mg.L⁻¹ a 271.202,8 mg L⁻¹ (flogopito) e de 61,36 mg.L⁻¹ a 368.895,8 mg.L⁻¹(verdete). A

concentração de ácido oxálico variou entre 0,20 mg L⁻¹ a 12,28 mg L⁻¹ e 0,23 mg.L⁻¹ a 6,82 mg.L⁻¹ para flogopito e verdete, respectivamente.

Entre os isolados avaliados, o isolado CMSV 798 identificado como *Penicillium sp.* se destacou, sendo o mais eficiente na produção dos três ácidos orgânicos independentemente do tipo de rocha. Os resultados apresentados demonstram que este isolado promoveu um acréscimo de mais de 1000 vezes nos teores de ácido cítrico e superiores a 200 mil nos teores de ácido láctico em relação ao controle.

Em pesquisa realizada por Leonel e Cerada (1995), a biosíntese de ácido cítrico em resíduo líquido de manipueira utilizando um isolado de *A. niger* atingiu concentrações de 2.560 mg.L⁻¹ de ácido cítrico em meio sintético, e em resíduo de manipueira 2.860 mg.L⁻¹.

Liaud et al. (2014) avaliaram 66 isolados de fungos filamentosos da coleção de culturas CIRM-F (International Center of Microbial Resources) oriundos de vários países quanto a produção de ácidos orgânicos e etanol em meio glicose líquido. Após seis dias de incubação os autores selecionaram três estirpes de *A. niger* como melhores produtores de ácido oxálico produzindo 1.600 mg.L⁻¹ (estirpe BRFM420), A BRFM422 como produtor de ácido cítrico (2.200 mg.L⁻¹) e BRFM431 foi selecionado por sua produção de ácido cítrico (2.100 mg.L⁻¹) e ácido glucônico (3.700 mg.L⁻¹). Neste estudo, a melhor estirpe produtora de ácido láctico também foi *A. niger* produzindo 100 mg.L⁻¹. Estes resultados reforçam o potencial de produção de ácidos orgânicos pelos isolados avaliados neste trabalho, uma vez que vários fungos são reconhecidos de fato na produção de ácidos orgânicos em larga escala.

Efetivamente observou-se uma correlação significativa entre a produção de ácidos orgânicos e solubilização de K ($r^* = 0,51, 0,48, 0,46$ para ácido cítrico, láctico e oxálico respectivamente). Este fato implica na capacidade de produção de ácidos orgânicos pelos fungos no processo de biosolubilização. Estes resultados são confirmados por estudos recentes que correlacionam a detecção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular por HPLC e métodos enzimáticos por micro-organismos solubilizadores (Archana et al., 2012; 2013; Zhang et al. 2013).

Sheng & He (2006) relataram que durante a solubilização de rochas potássicas por estirpes de *Bacillus edaficus* foram detectados 119 mg.L⁻¹ a 148 mg.L⁻¹ de ácido tartárico e 188 mg.L⁻¹ a 192 mg.L⁻¹ de ácido oxálico.

Vários autores relatam que os ácidos oxálico, tartárico, glucônico, cítrico, málico, láctico e succínico são os mais liberados durante a solubilização de K. (Wu et al., 2005; Sheng & He, 2006; Prajapati et al., 2012; Zarjani et al., 2013). Estes ácidos atuam na liberação do K fortemente ligado à estrutura tetraédrica de SiO₄ e AlO₄ através da liberação de íons H⁺, na formação de complexos com os cátions ligados ao mineral e a capacidade quelante de íons por meio dos grupos hidroxila e carboxila, componentes estruturais dos ácidos orgânicos (Meena et al., 2014)

Houve correlação negativa e significativa entre a produção de ácidos orgânicos e pH para ácido cítrico ($r = -0,34^*$). Para os demais ácidos esta correlação não foi significativa, embora também tenha sido observada uma associação negativa, o que sugere a relação entre a diminuição do pH e aumento da concentração de ácido. Vários autores apontam que ocorre acidificação do meio por meio da liberação de H⁺ proveniente principalmente da produção de ácidos orgânicos (Parmar & Sindhu, 2013; Behera et al., 2014; Meena et al., 2014) No entanto, Liaud et al. (2014) sugerem que apesar da presença de ácido orgânico ser o principal fator de acidificação do meio, nem sempre é observado esta correlação, pois em alguns casos esta também pode ser devida a remoção do amônio a partir do sulfato de amônio utilizado como fonte de Nitrogênio ou a excreção de H⁺ proveniente da assimilação do NH₄⁺.

Como resultado dessa análise, além do processo de solubilização, os fungos com alto potencial de produção de ácidos orgânicos, como o isolado CMSV 798, podem ser explorados de diversas formas. Além disso, como os ácidos avaliados no presente trabalho possuem uma gama de utilizações biotecnológicas e o mercado consumidor é crescente, a busca de fontes alternativas e de baixo custo para a sua produção torna-se cada vez mais relevante.

5. CONCLUSÕES

- 1) A genotipagem por ISSR e BOX-PCR foi capaz de detectar polimorfismos nos isolados fúngicos estudados, no entanto, ISSR apresentou melhor frequência e qualidade de amplificação e perfil de bandamento para geração de fingerprinting.
- 2) A partir da identificação taxonômica realizada por sequenciamento da região ITS, foi possível verificar a ocorrência de 11 gêneros, dentre os quais, *Penicillium*, *Trichoderma* foram os mais frequentes em todas as áreas de coleta, seguido de *Aspergillus* com exceção da área Cerrado.
- 3) A caracterização genética por meio do sequenciamento da região ITS e da genotipagem por ISSR são complementares e permitem acessar a diversidade inter e intraespecífica de fungos mantidos em bancos de germoplasma microbiano.
- 4) A genotipagem por ISSR foi eficaz em acessar a diversidade intra e interespecífica em *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*.
- 5) A identificação genética permite prospectar as funcionalidades e o potencial de aplicação biotecnológico de fungos para diversas áreas.
- 6) Há potencial de solubilização de K e produção de ácidos orgânicos entre os isolados avaliados, sendo que a eficiência solubilizadora de K variou em função do tipo de rocha e do isolado fungico. O isolado CMSV 798 destacou-se na produção de ácidos orgânicos independentemente da rocha utilizada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURJAILE, S.B.; SILVA, M.P. da; BATISTA, E.A.F.S.; BARBOSA, L.P.J.L.; BARBOSA, F.H.P. Pesquisa e caracterização da diversidade microbiológica do solo, na região de São José do Buriti – MG, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa (Cerrado) por plantações de eucalipto. **Ciência equatorial**, v. 1, p. 69-81, 2011.

ABDOLLAHZADEH, J.; ZOLFAGHARI, S. Efficiency of rep-PCR fingerprinting as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: Botryosphaeriaceae species as a case study. **FEMS Microbiology Letters**, p. 1-14, 2014.

ADRIO, J.L.; DEMAINE, A.L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, p.191-199, 2003.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996, 865p.

ALVES, A.; HENRIQUE, I.; FRAGOEIRO, S.; SANTOS, C.; PHILLIPS, A.J.L.; CORREIA, A. Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomonium*. **Plant**

Pathology, v. 53, p. 629-634, 2004.

ALVES, L. **Solubilização de nutrientes contidos em rochas por fungos ectomírrizicos**. 2006. 99p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ALVES, L.; OLIVEIRA, V. L.; FILHO, G.N.S. Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 676-84, 2010.

ALVES, A.; HENRIQUES, I.; SANTOS, A.; TACÃO, M.; CORREIA, A. **Tipagem Genética de Microrganismos**. 2007. 27p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, Aveiro.

APRIL, T.M.; ABBOTT, S.P.; FOGHT, J.M.; CURRAH, R.S. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 270-278, 1998.

ARCHANA, D.S.; NANDISH, M.S.; SAVALAGI, V. P.; ALAGAWADI, A.R. Screening of potassium solubilizing bacteria (KSB) for plant growth promotional activity. **Bioinfolet**, v. 9, p. 627-30, 2012.

ARCHANA, D.S.; NANDISH, M.S.; SAVALAGI, V. P.; ALAGAWADI, A.R. Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. **Bioinfolet**, v. 10, p. 248-57, 2013.

AZEVEDO, U.R.; MACHADO, M.M.M.; CASTRO, P.T.A.; RENGER, E.F.; TREVISOL, A.; BEATO, D.A.C. **Geoparque Quadrilátero Ferrífero (MG)**. Geoparques do Brasil / Propostas, v. 1, p. 183-220, 2012.

BATISTA, P.P.; SANTOS, J.F.; OLIVEIRA, N.T.; PIRES, A.P.D.; MOTTA, C.M.S.; ALVES, L.A. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. **Genetic Molecular Research**, v. 7, p. 706-717, 2008.

BEHERA, B.C.; SINGDEVSACHAN, R.R.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 97-110, 2014.

BERG, G.; ZACHOW, C.; LOTTMANN, J.; GO'TZ,M.; COSTA, R.; SMALLA, K. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* kleb. **Applied and environmental microbiology**, v, 71, p. 4203-4213, 2005.

BERGSTEN-TORRALBA, L.R.; NISHIKAWA, M.M.; BAPTISTA, D.F.; MAGALHÃES, D.P.; SILVA, M. Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment Brazillian. **Journal of Microbiology**, v. 40, p. 808-817, 2009.

BHALERAO, T. S.; PURANIK, P.R. Microbial degradation of monocrotophos by *Aspergillus oryzae*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 503-508, 2009.

BILLS, G.F.; CHRISTENSEN, M.; POWELL, M.; THORN, G. Saprobic soil fungi. In: MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S.(Ed). **Biodiversity of fungi- inventory and monitoring methods**. Amsterdam: Elsevier, 2004. p. 271-302.

BILLS, G.L.; POLYSHOOK, J.D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, v. 86, p. 187-198, 1994.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3. . . 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426-438, 2011.

BRASILEIRO, B.T.R.V.; COIMBRA, M.R.M.; MORAIS, J.R, M.A.; OLIVEIRA, N.T. de. Variabilidade genética em espécies de *Fusarium solani* revelada pela técnica de impressão genética baseada em marcadores PCR. **Journal of. Microbiology**, v. 35, p. 305-310, 2004.

BRANDÃO, J,A,V.; LOPES-ASSAD, M.L.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Solubilization of diabase and phonolite dust by filamentous fungus. **Ceres**, v. 61, p. 740-745, 2014.

BORBA, R. de S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 565-569, 2005.

BUÉÉ, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, R.H.; UROZ, S.; MARTIN, F. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, v. 184, p. 449-456, 2009.

CALISTRU, C.; MCLEAN, M.; BERJAK, P. In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. **Mycopathologia**, v. 137, p. 115-124, 1997.

CARMO, F. F.; CARMO, F. F.; SALGADO, A. A. R.; JACOBI, C. M. Novo sítio espeleológico em sistemas ferruginosos, no Vale do Rio Peixe Bravo, norte de Minas Gerais, Brasil. **Espeleo-Tema**, v. 22, p. 25-39, 2011.

CARVALHO, V. G. **Comunidades de fungos em solo do Cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo de soja e algodão**. 2008. 62p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CASTRILLÓN, M.R. Tipagem molecular de leveduras associadas a vinhos do sul do Brasil: padronização de msp-pcr *fingerprinting*. 2012, 94p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHAPIN, F.S.; ZAVALTA, S.E.; EVINER, V. T.; NAYLOR, R.L.; VITOUSEK, P. M.;

REYNOLDS, H. L.; DÍAZ, S. Consequences of changing biodiversity. **Nature**, v. 405, p. 234-242, 2000.

CHAVES, A.P. Rotas tecnológicas convencionais e alternativas para a obtenção de fertilizantes. In: FERNANDES, F.R.; LUZ, A.B.; CASTILHOS, Z.C. **Agrominerais para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010, p. 45-60.

CHEN, C.; SHAW, C.; CHEN, C.; TSAI, Y. 2,3,4-trimethyl-5,7-dihydroxy-2,3-dihydrobenzofuran, a novel antioxidant from *Penicillium citrinum* F5. **Journal of natural products**, v. 65, p. 740-741, 2002.

CHIAL, H. DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. **Nature Education**, v. 1, p. 176, 2008.

CONSOLO, V. F.; MONACO, C.I.; CORDO, C.A.; SALERNO, G.L. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1389-1398, 2012.

COSTA, P.M.O.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MALOSSO, E. Diversity of filamentous fungi in different systems of land use. **Agroforest System**, v. 85, p. 195-203, 2012.

COSTA, C.M.R. Biodiversidade em Minas Gerais-Um atlas para sua conservação. 1ªed. Belo Horizonte: **Fundação Biodiversitas**, 1998, 237p.

CROUS, P.W. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Fungal Diversity**, v. 38, p. 1-24, 2009.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 470-478, 2005.

DAS, S.; DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 80-100, 2014.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T.A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 36-50, 2010.

DHAKE, A.B.; PATIL, M.B. Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 194-199, 2007.

DIX, N.J.; WEBSTER, J. **Fungal Ecology**. London: Chapman & Hall, 1995. 549p.

DOMSCH, H.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. San Francisco: Editora IHW-Verlag v. I, 1993. 859p.

DRUZHININAL, I.S.; SEIDL-SEIBOTHL, V. ; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B.A.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P.K.; ZEILINGERL, S.; GRIGORIEV, I.V. ; KUBICEKL, C.P. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 749-759, 2011.

EDEL, V. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P.(Ed.) **Applications of PCR in Mycology**. Cambridge: University Press, 1998. p. 1-20.

EISENSTEIN, B.I. The Polymerase Chain Reaction - A New Method of Using Molecular Genetics for Medical Diagnosis. **The new England journal of medicine**, v. 322, p. 178-183, 1990.

ENDO, A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. 1976. ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterolgenesis produced by Penicillium citrinin. **Journal of Antibiotics**, v. 29, p. 1346-1348, 1976.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2^a ed. Caxias do Sul: EDUCS; 2010. p. 535-556.

FAN, T.; LIU, Y.; FENG, B.; ZENG, G.; YANG, C.; ZHOU, M.; ZHOU, H.; TAN, Z.; WANG, X. Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by Penicillium simplicissimum: Isotherms, kinetics and thermodynamics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, p. 655-661, 2008.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^a ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FRANZ, A.; BURGSTALLER, W.; SCHINNER, F. Leaching with Penicillium simplicissimum: influence of metals and buffers on proton extrusion and citric acid production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 769-774, 1991

GADANHO, M.; ALMEIDA, J.M.G.C.F.; SAMPAIO, J.P. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, p. 217-227, 2003.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and conservation**, v. 16, p. 69-72, 2007.

GILGADO, F.; CANO, J.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of the Pseudallescheria boydii species complex: proposal of two new species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4930-4942, 2005.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Amplification of anonymous DNA fragments using pairs of long primers generates reproducible DNA fingerprints that are sensitive to genetic variation. **Electrophoresis**, v. 18, p. 1512-1518, 1997.

GIUBILEI, M. A.; LEONARDI, V.; FEDERICI, E.; COVINO, S.; ŠAŠEK, V.;

NOVOTNY, C.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A.; PETRUCCIOLI, M. Effect of mobilizing agents on mycoremediation and impact on the indigenous microbiota. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 836-844, 2009.

GOMEZ, E.; PIOLI, R.; CONTI, M. Fungal abundance and distribution as influenced by clearing and land use in a vertic soil of Argentina. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, p. 373-377, 2007.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 376-393, 2000.

HARMAN, G.E.; KUBICEK, C. P. **Trichoderma And Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics**. London: CRC Press, 2002. 300 p.

HATTI, A.D.; TAWARE, S.D.; TAWARE, A.S.; PANGRIKAR, P.P, CHAVAN, A.M, MUKADAN, D.S. Genetic diversity of toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strains using ISSR markers. **International Journal of Current Research**, v. 5, p. 61-66, 2010.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L.Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature reviews**, v. 9, p. 177-192, 2011.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. **Mycology Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17-25, 2012.

HOUBRAKEN, R.P.J.; DE VRIES, R.A.; SAMSON. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86, p. 199-249, 2014.

HUANG, J.X.; ZHANG, J. ZHANG, X.R.; ZHANG, K.; ZHANG , X.; HE, X.R. *Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, p. 1237-1243, 2014.

HUANG, Q.; TEZUKA, Y.; HATANAKA, Y.; KIKUCHI, T.; NISHI, A.; TUBAKI, K. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. III. New sesquiterpene alcohol from *Trichoderma koningii*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 43, p. 1035-1038, 1995.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-762, 1991

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 278-285, 1998.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no

Quadrilátero Ferrífero, MG. **Megadiversidade**, v. 4, p. 24-32, 2008.

JONG, S.C.; DONOVICK, R. Antitumor and antiviral substances produced by fungi. **In advances in applied microbiology**, v. 34, p. 183-262, 1989.

JOOSTEN, H.; YING, H.; NIU, W.; VERVOORT, J.; DUNAWAY-MARIANO, D. hydrolyase within the isocitrate lyase/PEP Identification of fungal oxaloacetate. **Proteins**, v. 70, p. 157-166, 2008.

JORGENSEN, H.; ERIKSSON, T.; BORJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 851-861, 2003.

JURJEVIC, Z.; PETERSON, S.W.; STEA, G.; SOLFRIZZO, M.; VARGA, J.; HUBKA, V.; PERRONE, G. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. **IMA Fungus**, v. 3, p. 159-73, 2012.

KANG, S.; MILLS, A.L. The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 242-250, 2006.

KAPRI, A.; LAKSHIMI T. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 787-795, 2010

KATAYAMA, A.; MATSUMURA F. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 1059-1065. 1993.

KIM, W.G.; SONG, N.K.; YOO, I.D. Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum*. **The Journal Of Antibiotics**, v. 54, p. 831-835, 2001.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KNOPS, M.H. Mechanisms of plant species impacts on ecosystem nitrogen cycling **Ecology Letters**, v. 5, p. 454-446, 2002.

KO, W.H.; TSOU, Y.J.; JU, Y.M.; HSIEH, H.M.; ANN, P.J. Production of a fungistatic substance by *Pseudallescheria boydii* isolated from soil amended with vegetable tissues and its significance. **Mycopathologia**, v. 169, p. 125-131, 2010.

KOIKE, N.; HYAKUMACHI, M.; KAGEYAMA, K.; TSUYUMU, S.; DOKE, N. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignifications and superoxide generation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 10, p. 523-533, 2001.

KOZLOVSKY, A.G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T.V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, p. 1-10, 2012.

KULLNIG, C.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C.P. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. **Mycological Research**, v. 104, p. 1117-1125, 2000.

KUMAR, A.R.; SATHISH, V; NAIR, G,B; NAGARAJU, J. Genetic characterization of vibrio cholera strain by inter simple sequence repeat-PCR. **FEMS Microbiology letters**, v. 272, p. 251-258, 2007.

KUMAR, M.; SHARMA, P. A study on corroboration between DNA markers (RAPD, ISSR, ITS) and bio-control efficacy of *Trichoderma* species. **Fungal Genomics and Biology**, v. 1, p. 1-6, 2011.

KURAMATA, M.; FUJIOKA, S.; SHIMADA, A.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. Citrinolactones A,B and C, and sclerotinin C, plant growth regulator from *Penicillium citrinum*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 71, p. 499-503, 2007.

LAMRANI, K.; LAKHTAR,H.; ISMAILI-ALAOUI, M.; ETTALIBI, M.; BOIRON, P.; AUGUR, C.; GAIME-PERRAUD, I.; ROUSSOS, S. Production of fumagillin by *Aspergillus fumigatus* isolated from traditional trituration units, "Maasra", in Morocco **Micology. Applied. Internacional**, v. 20, p. 35-41, 2008.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LEITÃO, A.L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p.1392-1717, 2009.

LEONEL, M.; CERADA, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus Níger*. **Scientia. Agrícola**, v. 52, p. 299-304, 1995.

LIAUD, N.; GINIÉS, C.; NAVARRO,D.; FABRE, N.; CRAPART, S.; HERPOËL-GIMBERT, I.; LEVASSEUR, A.; RAOUCHE, S.; SIGOILLOT, J.C. Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 1, p.1-10, 2014.

LOPES-ASSAD, M.; AVANSINI, S.H.; ROSA, M.M.; CARVALHO, J.R.P.; ANTONINI, S.R.C. The solubilization of potassium-bearing rock powder by *Aspergillus niger* in small-scale batch fermentations. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 598-605, 2010.

LOPES-ASSAD, M.L.; ROSA, M.M.; ERLER, G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. . Solubilização de pó-de-rocha por *Aspergillus niger*. **Espaço & Geografia**, v. 9, p. 1-17,

2006.

MAEDA R N.; BARCELOS, C.A.; SANTA ANNA, L.M.M.; JUNIOR, N.P. Production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 38-44, 2013.

MAGNUSON, J.K.; LASURE, L.L. Organic acid production by filamentous fungi. In: **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine**. TKACZ, J. S.; LANGE, L (Eds). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. p. 307-340.

MAIA, L.C.; CAVALCANTI, M.A.Q.; GILBERTONI, T.B.; GOTO B.T.; YANO-MELO A.M.; BASEIA I.G.; SILVERIO, M.L. Fungos. In: PORTO, K. C.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; TABERELLI, M (Eds). **Diversidade biológica e conservação da floresta atlântica ao norte do rio São Francisco**, 1ªed. Brasília: Ministério do meio ambiente, 2006. p.75-108.

MARRIEL, I.E.; COELHO, A M.; GUIMARÃES, P.S.; SOARES, E.M.; NONATO, L.F.V.; OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C. Seleção de isolados de fungos biossolubilizadores de rochas silicáticas in vitro. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2006. Dourados. **Anais...** Embrapa Agropecuaria Oeste. CDROM

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZI E.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D.A.; BOULNOIS G.J.; CLAVERY J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 3479–3483, 1992.

MARTINS, E.S.; RESENDE, A.V.; OLIVEIRA, C.G.; NETO, A.E.F. Materiais silicáticos como fontes regionais de nutrientes e condicionadores de solos. . In: FERNANDES, F.R.; LUZ, A.B.; CASTILHOS, Z.C. **Agrominerais para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. p. 89-104.

MARTINS, F.A. **Integração de dados morfoagronômicos, moleculares e fitopatológicos para estabelecimento de coleção nuclear**. 2011. 119p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MASTOURI, F.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v. 25, p. 1264-1271, 2012.

MEENA, V. S.; MAURYA, B.R.; VERMA, P. Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? **Microbiological Research**, v. 169, p. 337-347, 2014.

MEHTA, Y.R.; MEHTA, A.; ROSATO, Y.B. ERIC and REP-PCR banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani*

isolates from cotton. **Current Microbiology**, v. 44, p. 323-328, 2002.

MELLO, C.S.M.; REIS, A.; SILVA, J.T.B.; Manual de curadores de germoplasma - Micro-organismos: Fungos filamentosos. **Documentos**,134. Brasília, DF: Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia, 2011. 25p.

MENEZES, J.P.; LAPUATINI, M.; ANTONIOLLI, Z.I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C.G. Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp.(Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f.sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 132-139, 2010.

MÉNDEZ, A.; PÉREZ, C.; MONTAÑÉZ, J.C.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR, C.N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University-SCIECE B**, v. 12, p. 961–996, 2011.

MEYER, W.; KOCH, A.; NIEMANN, C.; BEYERMANN, B.; EPPLEN, J.T.; BÖRNER, T. Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. **Current Genetics**, v. 19, p. 239-242, 1991.

MEYER, W.; LATOUCHE, G. N.; DANIEL, M. H.; THANOS, T. G.; MITCHELL, D.; YARROW, G.; SCHÖNIA.,; SORRELL, T. C. Identification of pathogenic yeasts of the imperfect genus *Candida* by PCR-fingerprinting. **Electrophoresis**, v. 18, p. 1548-1559, 1997.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA, BRASIL. **Biodiversidade**. Disponível em : <[HTTP://www.mma.gov.br/biodiversidade](http://www.mma.gov.br/biodiversidade)> Acesso em 11 out. 2015.

MISHRA, P.K.; FOX, R.T.V. ; CULHAMM, A. Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and longrange dispersal in *Fusarium culmorum*. **School of Plant Sciences**, v. 143, p. 291-301, 2003.

MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v. 62, p. 442-447, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª edição. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p..

MOROZKINA, E. V.; E. S. SLUTSKAYA, T. V. FEDOROVA, T. I. TUGAY, L. I. GOLUBEVA AND O. V. KOROLEVA. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, p. 1-14, 2010.

MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. **Biodiversity of fungi**: Inventory and monitoring methods. Burlington: Elsevier academic press, 2004. 777p.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD

markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 597-602, 1997.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 655-670, 2003.

NETO, F.A.E.; VALE, F.R.; RESENDE, A. V. ; GUILHERME, L.R.G.; GUEDES, G.A.A. **Fertilidade do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 252p.

NILSSON, R.H.; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.LARSSON, K. H. Intraspecific ITS variability in the kingdom *Fungi* as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 4, p. 193-201, 2008.

O'BRIEN, H.E.; PARRENT, J.L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5544-50, 2005.

OKOTH, S.A.; ROIMEN, H.; MUTSOTSO, B.; MUYA, E.; KAHINDI, J.; OWINO, J.O.; OKOTH, P. Land use systems and distribution of *Trichoderma* species in Embu region, Kenya. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 7, p. 105-122, 2007.

OLIVEIRA, B.R. **Identification and fingerprinting of cork fungi: a phenetic approach**. 2011. 44p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Lisboa, Lisboa.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L.D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multiciência**, p. 1-18, 2006.

ONOFRI, S.; ANASTASIA.; DEL FRATE, G.; DI PIAZZA, S.; GARNERO, N.; GUGLIELMINETTI, M.; ISOLA, D.; PANNO, L.; RIPA, C.; SELBMANN, L.; VARESE, G. C.; VOYRON, S; ZOTTI, M.; ZUCCONI, L. Biodiversity of rock, beach and water fungi in Italy. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*: **Official Journal of the Societa Botanica Italiana**, v. 145, p. 978-987, 2011.

PARMAR, P.; SINDHU, S.S. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. **Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 25-31, 2013.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; FRISVAD, J.C.; MEIJER, M.; SAMSON, R.A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PFENNING, L.H; ABREU, L.M. Diversity of microfungi in tropical soils. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. BRUSSAARD, L.(Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI, 2006. p.184-205.

PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Food Science

Australia a Joint Venture of CISTRO and AFISC, 2000, 197p.

PORTER, T.M.; GOLDING, G.B. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? **New Phytologist**, v. 192, p. 775-782, 2011.

PRAJAPATI, K B.; SHARMA, M.C.; MODI, H.A. Isolation of two potassium solubilizing fungi from ceramic industry soils. **Life Science Leaflets**, v. 5, p. 71-75, 2012.

PRAJAPATI, K B.; SHARMA, M.C.; MODI, H.A. Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on *Abelmoscus esculantus*. **International Journal of Agriculture Sciences**, v. 3, p. 181-188, 2013.

PRAKASH, R.; JHA, S.N. Basics of the Genus *Aspergillus*. **International Journal of Research in Botany**, v. 4, p. 26-36, 2014.

PURVIS, A.; HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity. **Nature**, v. 405, p. 212-219, 2000.

REDDY, M.P; SARLA, N; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.

RIOU, C.; SALMON, J.M.; VALLIER, M.J.; GUANATA, Z.; BARRE, P. Purification, Characterisation and substrate specificity of a novel highly glucose-Tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Environment Microbiology**, v. 64, p. 3607-3614, 1998.

SAGHAI-MARROF, M.A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, L.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in Barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Population Biology**, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SAIKI, R.K.; SHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMUELS, G.J. Trichoderma: A review of biology and systematics of the genus. **Mycology. Research**, v. 100, p. 923-35, 1996.

SANTOS, V. B.; WELLBAUM, C.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. fungos filamentosos do solo da ilha dos eucaliptos na represa do Guarapiranga em São Paulo, SP. **Acta botânica.brasílica**, v, 12, p. 101-110, 1998.

SAY, R.; YILMAZ, N.; DENIZLI, A. Removal of chromium(VI) ions from synthetic solutions by the fungus *Penicillium purpurogenum*. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, p. 276-280, 2004.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.;

LEVESQUE, C.A.; CHEN,W and Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi **PNAS**, v. 109, p. 6241-6246, 2012.

SELBMANN, L.; EGIDI, E.; ISOLA, D.; ONOFRI, S.; ZUCCONI,L.; HOOG , G. S.; CHINAGLIA,S.; TESTA,L.; TOSI,S.; BALESTRAZZI A.; LANTIERI A.; COMPAGNO R.; TIGINI,V ; VARESE, G.C. Biodiversity, evolution and adaptation of fungi in extreme environments, *Plant Biosystems. An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, v. 147, p. 237-246, 2013.

SHAHID, M.; SRIVASTAVA, M.; KUMAR, V.; SINGH, A.; PANDEY.S. Genetic Determination of Potential Trichoderma Species Using ISSR (Microsatellite) Marker in Uttar Pradesh, India. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 6, p. 174-178, 2014

SHENG, X.F. HE, L.Y. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 66-72, 2006

SILVA-FILHO, E.A., SANTOS, S.K.B., RESENDE, A.M., MORAIS, J.O.F.,MORAIS JR., M.A., SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13- 23, 2005.

SILVA, U.C.; MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, C.A.; GOMES, E.A.; RESENDE, A.V.; LANA, U.G.P. Biossolubilização de potássio in vitro a partir da rocha fonolito por microrganismos do solo. **Documentos**. 177: Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2015. 28 p.

SINGH, B.K. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 111-116, 2009.

SMITH, N.C.; HENNESSY, J.; STEAD, D.E. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1R primer for rapid identification of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 739-748, 2001.

SONG, G.S.; KIM, C.K.; KWON, Y.J.; YANG, H.C.; LEE, T.K. Studies on fungal lipids containing γ -linolenic acid.1 Fatty acid composition of *Mucor* sp. **Journal of the Korean Society of Food Nutrition**, v. 19, p. 636-640, 1990.

SOUZA, C.N. **Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica**. 2010. 66p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUZA, I.C.A. **Influência do tamanho de partícula na dissolução do íon potássio da rocha flogopitito**. 2013. 134p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

STALEY, J.T. Biodiversity: are microbial species threatened? Current opinion biotechnology, v. 8, p. 340-345, 1997

STERN, M.J.; AMES, G.F.L.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, p. 1015-1026, 1984

STRAATEN, P.V. Rochas e minerais como fertilizantes alternativos na agricultura: uma experiência internacional. In: FERNANDES, F.R., LUZ, A.B., CASTILHOS, Z.C. **Agrominerais para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010.

SU, J.; YANG, M. Huperzine A production by *Paecilomyces tenuis* YS-13, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*. **Natural Product Research**, v. 29, p. 1035-1041, 2015.

SUNG, G.H.; SHRESTHA, B.; HAN, S.K.; SUNG, J.M. Cultural Characteristics of *Ophiocordyceps heteropoda* Collected from Korea. **Mycobiology**, v. 39, p. 1-6, 2011.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; SEMAN, M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; SEDLA'CEK, I., SWINGS, J. Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p. 59-63, 2005.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M.F. Occurrence and structural diversity of fungal metabolites with antibiotic activity. **Quimica Nova**, v. 31, p. 1807-1813, 2008.

TAKAHATA, Y.; HIRUMA, M.; SUGITA, T. A case of onychomycosis due to *Aspergillus sydowii* diagnosed using DNA sequence analysis. **Mycoses**, v. 51, p. 170-173, 2008.

TAKEDA, I.; TAMANO, K.; YAMANE, N.; ISHII, T.; MIURA, A.; UMEMURA, M.; TERAJ, G.; BAKER, S.E.; KOIKE, H.; MACHIDA, M. Genome sequence of the Mucoromycotina fungus *Umbelopsis isabellina*, an effective producer of lipids. **Genome Announc**, v. 2, 2014.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S.M.; KHOR, E. The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, p. 239-242, 1996.

TANG, H.Y.; ZHANG, Q.; LI, H.; GAO, J.M. Antimicrobial and allelopathic metabolites produced by *Penicillium brasilianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 345-348, 2014.

TAYLOR, J.W. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. **IMA Fungus**, v. 2, p. 113-120, 2011.

TEDERSON, L.; NILSSON, R.H.; ABARENKOV, K.; JAIRUTS, T.; SADAM, A.; SAAR, I.; BAHRAM, M.; BECHEM, E.; CHUYONG, G.; KÕLJALG, U. Pyrosequencing and sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungus provide similar results but reveal substantial methodological biases. **New Phytologist**, v. 166, p. 1063-1068, 2010.

TOLEDO PIZA, P.A.; BERTOLINO, L.C.; SILVA, A.A.S.; SAMPAIO, J.A.; LUZ, A.B. Verdete da região de Cedro do Abaeté (MG) como fonte alternativa para potássio. **Geociências**, v. 30, p. 345-356, 2011.

TRINDADE, A.V.; GRAZZIOTTI, P.H.; TÓTOLA, M.R. Utilização de características microbiológicas na avaliação da degradação ou recuperação de uma área sob mineração de ferro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 24, p. 683-688, 2000.

VAN DEN BERG, M.A.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; BADGER, J.H.; DARAN, J.M.; DRIESSEN, A.J.; GARCIA-ESTRADA, C.; FEDOROVA, N.D.; HARRIS, D.M.; HEIJNE, W.H.; JOARDAR, V.; KIEL, J.A.; KOVALCHUK, A.; MARTIN, J.F.; NIERMAN, W.C.; NIJLAND, J.G.; PRONK, J.T.; ROUBOS, J.A.; VAN, D.K.I.; VAN PEIJ, N.N.; VEENHUIS, M.; VON DOHREN, H.; WAGNER, C.; WORTMAN, J.; BOVENBERG, R.A. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1161-1168, 2008.

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. **Geomicrobiology Journal**, v. 31, p. 751-763, 2013.

VAZOLLER, R.F., CANHOS, V. P. Coleções de Culturas e Serviços e Centros de Recursos Biológicos. **Nota Técnica**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, São Paulo, 2005.

VELÁSQUEZ, V. B.; CÁRCAMO, M.P.; MERIÑO, C.R.; IGLESIAS, A.F.; DURÁN, J.F. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 89-99, 2007.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VISAGIE C.M.; HIROOKA, Y.; TANNEY, J.B.; WHITFIELD, E.; MWANGE, K.; MEIJER, M.; AMEND, A.S.; SEIFERT, K.A.; SAMSOM, R.A. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies Mycology**, v. 78, p. 63-139, 2014.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of

fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols : A guide to Methods and Applications** AcademicPress: San Diego, 1990. p. 315-322.

WU, S.C.; CAO, Z.H.; LI, Z.G.; CHEUNG, K.C.; WONG, M.H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, v. 125, p. 155-166, 2005.

WANG, J.G.; ZHANG, F.S.; ZHANG, X.L.; CAO, Y.P. Release of potassium from K-bearing minerals: Effect of plant roots under P deficiency. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 56, p. 45-52, 2000.

ZARI, M.P. Ecosystem Services Analysis in Response to Biodiversity Loss Caused by the Built Environment. **S.A.P.I.E.N.S**, v. 7, P. 1-14, 2014.

ZARJANI, J.K.; ALIASGHARZAD, N.; OUSTAN, S.; EMADI, M.; AHMADI, A. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 77, p.75-89, 2013.

ZHANG, A.; ZHAO, G.; GAO, T.; WANG, W.; LI, J.; ZHANG, S. Solubilization of insoluble potassium and phosphate by *Paenibacillus kribensis* CX-7: a soil microorganism with biological control potential. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 41-47, 2013.

ZHANG, F. KONG. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. **Applied. Soil Ecology**, v. 82, p.18-25, 2014.

ZHOU, S.; SMITH, D.R.; STANOSZ, G.R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. **Mycological Research**, v. 105, p. 919-926, 2001

ANEXO(S)

Anexo I. Resultados da análise química de alguns atributos do solo em Capim, Canga, Cerrado, Eucalipto e Mata.

Local/amostra*	pH	Mat. orgânica	Carbono	Fósforo Melich 1	K	H+Al	Al	Ca	Mg	SB	CTC	V	Sat.al
	H ₂ O	dag/kg	(%)	mg/dm	-----cmolc/dm ³ -----							(%)	(%)
Canga	4,6	7,03	4,0875	4,0275	58,75	16,245	0,905	0,8875	0,1975	1,235	17,48	6,25	45,94
Capim	6,2	2,395	1,3925	7,8125	62,25	1,4075	0,01	1,43	0,52	2,1075	3,515	60,75	0,39
Cerrado	4,85	3,3975	1,975	1,2575	55,75	5,895	1,4525	0,295	0,095	0,535	6,43	8,5	73,0925
Eucalipto	4,6	6,7225	3,91	3,9575	47,75	12,215	2,45	0,1025	0,0675	0,2925	12,5075	2,5	88,4075
Mata	4,925	4,5275	2,6325	2,4625	97	9,1625	1,485	0,995	0,665	1,9075	11,07	17	45,2075

*Média de 4 repetições