



Universidade Federal do Maranhão

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

**DIVERSIDADE E TOLERÂNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
EM PLANTAS SUJEITAS A ESTRESSES CAUSADOS POR
METAIS PESADOS**

LEANDRO SOUZA SILVA

SÃO LUÍS/MA

2018

LEANDRO SOUZA SILVA

**DIVERSIDADE E TOLERÂNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
EM PLANTAS SUJEITAS A ESTRESSES CAUSADOS POR
METAIS PESADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Glécio Machado Siqueira

Coorientador: Prof. Dr. Juliano dos Santos

SÃO LUÍS

2018

Leandro Souza Silva

Diversidade e Tolerância de Fungos Endofíticos em Plantas Sujeitas a Estresses Causados por Metais Pesados / Leandro Souza Silva – São Luís: MA, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Glécio Machado Siqueira

Coorientador: Prof. Dr. Juliano dos Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, 2017.

LEANDRO SOUZA SILVA

**DIVERSIDADE E TOLERÂNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM
PLANTAS SUJEITAS A ESTRESSES CAUSADOS POR METAIS
PESADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof.. Dr. Juliano dos Santos

Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Priscila Pauly Ribas

Fundação Centro de Análise, Pesquisa e Inovação Tecnológica – FUCAPI

Prof . Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnoll

Universidade Federal do Maranhão

“Quanto mais conhecemos, mais amamos.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve ao meu lado.

A minha mãe por sempre estar presente.

Ao Prof. Dr. Juliano dos Santos pelos seus incentivos, disponibilidade e sólidos ensinamentos.

A Francisco pela colaboração, apoio e companheirismo.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa em Diversidade e Ecologia Microbiana – GPDEM.

Aos meus amigos Joyce, Raiza, Mairla e Nurzia pela colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr e a equipe do Laboratório de Estudos Botânicos do Departamento de Biologia da UFMA.

A todos os professores de todas as disciplinas pelos ensinamentos.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os membros do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão.

A todos que de algum modo foram importantes colaboradores na realização da pesquisa.

RESUMO

Um dos principais problemas do mundo contemporâneo é a contaminação do solo e da água por metais pesados. Muitos microrganismos, como os fungos, por exemplo, podem interagir com esses metais pesados do ambiente adquirindo a capacidade de sobreviver por meio de adaptação ou mutações, sendo considerados promissores agentes de biorremediação. Os objetivos deste trabalho foram: (I) avaliar a frequência de fungos endofíticos em plantas de locais sujeitos a contaminação por metais pesados e (II) avaliar a tolerância *in vitro* destes fungos ao mercúrio. Folhas de oito espécies de plantas foram coletadas as margens do Igarapé do Sabino, em região fortemente influenciada pelo Aterro Sanitário da Ribeira, São Luis, Brasil. Essas folhas foram desinfestadas superficialmente e plaqueadas em meio BDA. Os fungos endofíticos recuperados foram purificados, identificados e depositados na coleção micológica do NIBA/UFMA. A tolerância ao mercúrio das 10 espécies predominantes foi avaliada pelo crescimento micelial destas em placas com meio BDA suplementado com HgCl_2 em sete concentrações (1 a 7 mg.mL^{-1}). No total, 54 isolados foram obtidos. Foram registrados fungos pertencentes a 28 tipos morfológicos distribuídos em 11 gêneros. Análises do Índice de Tolerância (TI) e do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial indicaram que, apesar de diferenças no comportamento frente ao mercúrio, muitos fungos exibiram níveis de tolerância satisfatórios ao metal. *Scytalidium lignicola* e *Trichoderma* sp. apresentaram alta tolerância e crescimento elevado em meios contendo altas concentrações de HgCl_2 , indicando a possibilidade do uso desses fungos em trabalhos de biorremediação de ambientes contaminados.

Palavras-chave: Biorremediação; Endófitos; Microrganismos; Pestalotiopsis; Plantas.

ABSTRACT

One of the main problems of the contemporary world is the contamination of soil and water by heavy metals. Many microorganisms, such as fungi, for example, may interact with these heavy metals in the environment acquiring the ability to survive by adaptation or mutations, and are considered promising bioremediation agents. The objectives of this study were: (I) to evaluate the frequency of endophytic fungi in plants of sites subject to contamination by heavy metals, and (II) to evaluate the *in vitro* tolerance of these fungi to mercury. Leaves of eight plant species were collected along the river banks of the Sabino Tributary Stream, in a region heavily influenced by the Sanitary Landfill of Ribeira, São Luís, Brazil. These leaves were surface disinfested and plated in BDA medium. The recovered endophytic fungi were purified, identified and deposited in the mycological collection of NIBA / UFMA. The mercury tolerance of the 10 predominant species was evaluated by the mycelial growth of these in plates with BDA medium supplemented with HgCl₂ in seven concentrations (1 to 7 mg.mL⁻¹). In total, 54 isolates were obtained. Fungi belonged to 28 morphological types distributed in 11 genera. The Tolerance Index (TI) and Mycelial Growth Rate Index analyzes indicated that, despite differences in behavior under stress caused by mercury, many fungi exhibited satisfactory levels of tolerance to the metal. *Scytalidium lignicola* and *Trichoderma* sp. showed high tolerance and high growth in media containing high concentrations of HgCl₂, indicating the possibility of the use of these fungi in bioremediation essays of contaminated environments.

Key-words: Bioremediation; Endophyte; Microorganisms; Pestalotiopsis; Plants.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

mg.L-1 – Miligramass por litro

L - Litro

m – Metros

pH – Potencial Hidrogênico

ppm – Parte por milhão

Hg – Mercúrio

Zn – Zinco

Cu – Cobre

Fe – Ferro

Pb – Chumbo

Cr – Cromo

Cd – Cádmió

HgCl₂ – Cloreto de mercúrio II

TI – Índice de Tolerância

IVCM – Índice de Velocidade de Crescimento Micelial

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação das plantas amostradas às margens do Igarapé do Sabino, São Luís, Maranhão, Brasil. Legendas: TC = taxa de colonização fúngica, “*” = espécie não identificada, “**” = planta identificada apenas em nível de família48
- Tabela 2.** Relação dos isolados de fungos endofíticos provenientes de plantas coletadas às margens do Igarapé do Sabino, depositados no banco de fungos do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA/UFMA).....49
- Tabela 3.** Identificação e frequência de fungos endofíticos isolados de plantas das margens do Igarapé do Sabino, São Luís, MA, Brasil. Legendas: P1= *L. lurida*, P2= Não identificada 2, P3= Chrysobalanaceae, P4= Myrtaceae, P5=*A. brasiliensis*, P6= *A. jupunba*, P7= *E. globosa*, P8= *A. vulgare*, F.A.= frequência absoluta e F.R.= frequência relativa52
- Tabela 4.** Índices de velocidade de crescimento micelial dos isolados. Letras minúsculas nas colunas mostram a significância entre as médias dos índices de velocidade de crescimento entre isolados60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de espécies de fungos por plantas. Legendas: M1-M8= morfoespécies de plantas 1-8.....44
- Figura 2.** Frequência relativa de fungos endofíticos isolados em plantas das margens do Igarapé do Sabino, São Luís, MA, Brasil51
- Figura 3.** Gráficos de regressão do crescimento (eixo y, em mm) em função da concentração de mercúrio (eixo x, em mg.L^{-1}) no meio de cultura para cada isolado estudado. *Aspergillus flavus* (LS52), *Aspergillus fumigatus* (LS10), *Aspergillus japonicus* (LS53), *Aspergillus niger* (LS51), *Aspergillus tamarii* (LS42), *Chaetomium globosum* (LS38), *Chaetomium* sp. (LS39), *Pestalotiopsis microspora* (LS49) *S. lignicola* (LS50), *Trichoderma* sp. (LS46).....53
- Figura 4.** Média dos índices de tolerância dos isolados cultivados por 10 dias em meio de cultura com 4 mg.L^{-1} de HgCl_2 55
- Figura 5.** Índices de tolerância dos isolados cultivados por 10 dias em 4 mg.L^{-1} de HgCl_256
- Figura 6.** Índices de tolerância dos isolados fúngicos cultivados por 10 dias em 4 mg.L^{-1} de HgCl_2 . *Aspergillus flavus* (LS52), *Aspergillus fumigatus* (LS10), *Aspergillus japonicus* (LS53), *Aspergillus niger* (LS51), *Aspergillus tamarii* (LS42), *Chaetomium globosum* (LS38), *Chaetomium* sp. (LS39), *Pestalotiopsis microspora* (LS49) *Scytalidium lignicola* (LS50), *Trichoderma* sp. (LS46).....57

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. Fungos Endofíticos	16
2.2. Metais Pesados	19
2.3. Fungos Endofíticos Tolerantes a Metais Pesados	22
2.4. Fungos Endofíticos e Sua Influência na Tolerância de Plantas a Metais Pesados	24
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivos Específicos	28
CAPÍTULO II	40
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Área de Estudo	44
2.2. Material Vegetal	45
2.3. Distribuição e Frequência de Fungos Endofíticos	45
2.4. Tolerância <i>in vitro</i> de Fungos Endofíticos ao Mercúrio	46
2.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística	47
3. RESULTADOS	48
3.1. Distribuição e Frequência de Fungos Endofíticos	48
3.2. Tolerância <i>in vitro</i> de Fungos Endofíticos ao Mercúrio	54
3.2.1. Crescimento Micelial	54
3.2.2. Índice de Tolerância	56
3.2.3. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial	58
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÕES	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
ANEXOS	77

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A maior parte da biodiversidade de espécies está abrigada nas regiões tropicais do planeta. Embora esse padrão de distribuição de espécies tenha sido relacionado a interações entre fatores tanto bióticos quanto abióticos, essas interações ainda são mal compreendidas. Devido a essa complexidade estrutural das florestas tropicais, muitas espécies que aí ocorrem são endêmicas e pouco conhecidas. Dentre os seres vivos, um grupo muito diverso e ainda pouco conhecido é o grupo dos microrganismos endofíticos (BANERJEE, 2011; BOTERO et al., 2013; RAJAMANIKYAM et al., 2017).

Calcula-se que existam aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos e que destas, apenas 74 mil são corretamente descritas. Contudo, essa medida de diversidade de espécies fúngicas está aberta a discussões, uma vez que dados recentes gerados por micologistas de regiões tropicais apontam que as estimativas são muito baixas, especialmente ao considerar fungos que não podem ser vistos a olho nu, dos quais os papéis ecológicos são pouco notáveis por ocuparem habitats específicos, como o interior de partes específicas de plantas, no caso dos fungos endofíticos (HAWKSWORTH, 2001; BANERJEE, 2011; SINGH et al., 2017).

Uma parcela pouco conhecida dos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habita o interior das plantas em uma relação simbiótica ou neutra. A definição do tipo de interação entre microrganismos endofíticos e plantas ainda é envolta em reflexões e confusa, pois diferentes autores definem o termo endofítico como meramente didático. Pode-se dizer que existe um gradiente entre os grupos de endofíticos e não-endofíticos, sem uma clara distinção ou limite entre eles (PEIXOTO NETO et al., 2002; AZEVEDO, 2014).

Desde o século XIX surgiram diferentes definições para os endofíticos, assim como tentativas de diferenciação entre os organismos que habitam o interior de plantas. Entretanto, a mais atual e mais completa definição considera todos os microrganismos cultiváveis ou não, que habitam o interior dos vegetais, sem causar danos à planta e que não desenvolvem estruturas

externas, ou seja, excluindo bactérias de nódulos de raízes e fungos micorrízicos (AZEVEDO, 2014).

Esses fungos podem apresentar diferentes distribuições nos variados tecidos das plantas hospedeiras. Os fungos endofíticos podem habitar todas as partes da planta, como folhas, flores, estruturas reprodutivas, pecíolos, galhos, ramos, cascas e raízes. Devido à simbiose existente entre fungo endofítico e planta hospedeira, no geral, várias substâncias podem ser sintetizadas pelos endófitos para promoverem o crescimento e a proteção do vegetal (FAETH, 2002; RODRIGUEZ et al., 2009; ZHENG et al., 2015).

A produção de metabólitos secundários é um dos principais mecanismos pelos quais o fungo beneficia a planta hospedeira (SCHULZ et al., 1995). Nesses casos, pode-se dizer que existe mutualismo de defesa, em outras palavras, o fungo está dando proteção à planta e protegendo a si próprio, uma vez que o mesmo estará habitando o interior da planta. Logo, pode-se dizer que as intrincadas interações mutualísticas entre fungos endofíticos e planta hospedeira são reguladas, pelo menos, a nível ambiental, resultando nos benefícios de adaptabilidade tanto para a planta quanto para o fungo (SAIKKONEN et al., 1998; AZEVEDO, 1999 RAJAMANIKYAM et al., 2017).

Sendo assim, a seleção do endófito para estudo deve ser realizada com espécies vegetais de diferentes biotas, principalmente as que habitam regiões estressantes e que enfrentam intensas alterações no ambiente como plantas de regiões áridas, florestas tropicais, regiões com influência salina ou áreas contaminadas por metais pesados (ALI et al., 2017). Nesse contexto, áreas que vem sofrendo com o despejo de metais pesados são consideradas favoráveis para a prospecção de fungos endofíticos resistentes ou tolerantes. Uma destas áreas é a do Aterro Municipal da Ribeira, que está localizada no sudoeste da Ilha do Maranhão, entre o Igarapé do Sabino e o Distrito Industrial, a uma distância de aproximadamente 20 km da área urbana da cidade de São Luís, Maranhão, Brasil (CAMPOS et al., 2009; MOHAMMADIAN et al., 2017).

A escolha do local para a instalação deste aterro deu-se em função do seu isolamento em relação às áreas habitadas da cidade, no entanto, o aterro localiza-se no curso superior da Sub-bacia do Sabino, e este fato tem causado vários problemas socioambientais pela proximidade de ocupações humanas mais atuais, com destaque a uma comunidade que desenvolve agricultura familiar próximo ao aterro. Desse modo, uma grande porção dos poluentes oriundos do Aterro da

Ribeira pode ficar retida nos solos argilosos das margens do igarapé, contaminando a fauna e a flora local, sem contar com os grandes níveis de mercúrio já detectados na água do igarapé que podem ser assimilados pela comunidade de plantas locais e ao longo da cadeia trófica (CAMPOS, 2009; ABUBAKARI et al., 2017).

A contaminação do solo com metais pesados tem uma influência negativa no crescimento e desenvolvimento de plantas, entre outros seres vivos, sendo que alguns desses metais são muito tóxicos mesmo em baixíssimas concentrações, por exemplo, o mercúrio (BHATTACHARYYA, et al., 2008). Muitas tentativas têm sido feitas para a remediação de ambientes contaminados por esses metais, como tratamentos eletroquímicos, trocas iônica, precipitação, osmose reversa, evaporação e sorção; no entanto, pouca eficiência tem sido notada além do alto custo desses métodos. Uma alternativa é a utilização do tratamento biológico de resíduos, tanto pelo baixo custo quanto pela boa acessibilidade (KADIRVELU et al., 2002; LUO et al., 2010; ZAHOOR et al., 2017).

Alguns fungos possuem a habilidade de tolerar esses metais em condições que são letais para outros organismos. Essa capacidade tem atraído o interesse de estudiosos devido aos seus mecanismos de sobrevivência a ambientes estressantes. Dessa forma, o crescimento vegetal por meio do incremento da tolerância concedida por fungos endofíticos pode ser aproveitado, o que aumenta a eficiência dos processos de biorremediação que utilizam plantas. Nota-se que as respostas a fatores abióticos, como estresse causado por metais, têm sido intensivamente estudadas sem que sejam levadas em consideração as interações simbióticas entre plantas e organismos endofíticos, uma vez que esses organismos podem ter considerável influência no desenvolvimento desses vegetais hospedeiros (ZAPOTOCZNY et al., 2007; SHAHABIVAND et al., 2017).

Nesse contexto, o conhecimento dessa diversidade em ambientes sujeitos a metais pesados, além de gerar uma melhor compreensão entre as relações entre microrganismo e hospedeiro, possibilitará a prospecção de fungos com potencial para remediação de áreas que já sofreram com o despejo de metais pesados. Estudos relacionados a metais pesados vêm sendo realizados mundialmente, mas ainda são escassos no Maranhão, o que indica a importância a nível local deste trabalho; a um nível de importância global, o mesmo proporcionará informações a respeito dos impactos de metais pesados na flora, mostrando como a associação simbiótica

entre fungos e plantas é fundamental para o estabelecimento de certas espécies vegetais no meio impactado por metais pesados, servindo como base para órgãos responsáveis na elaboração de leis e para trabalhos com outros grupos biológicos e que visem relacionar os declínios e distribuições populacionais da flora ao despejo de resíduos de metais pesados.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Fungos endofíticos

Apesar dos organismos endofíticos terem sido citados pela primeira vez no início do século XIX, foi Bary, em 1866, o responsável por delinear a diferença entre eles e patógenos de plantas. Em 1986, Carroll excluiu as micorrizas e os fungos patogênicos de plantas, restringindo o uso do termo endofítico a organismos que habitam o interior de plantas e causam infecções assintomáticas nos tecidos da porção interna dessas plantas. Desde então diversos estudiosos expuseram definições para o termo endofítico. Petrini (1991) expandiu a definição de Carroll por meio da inclusão de todos os microrganismos que, em alguma ocasião do seu ciclo de vida, invadem tecidos da porção interna desses vegetais, sem causar qualquer agravo ao hospedeiro, ou seja, essa definição engloba patógenos latentes.

Foi proposta a definição de que endófitos eram considerados microrganismos que são isolados de tecidos vegetais desinfectados superficialmente, e que não causam danos aparentes à planta hospedeira (HALLMANN et. al., 1997). Essa definição acaba por excluir populações não cultiváveis ou difíceis de serem mantidas em condições laboratoriais, ou seja, as populações pouco estudadas. Apesar de bem estudados, os microrganismos que habitam o interior de raízes não eram considerados endófitos, como bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos (GUIMARÃES, 2005).

Outra definição englobou microrganismos que habitam o interior de plantas sem causar qualquer efeito negativo imediatamente (FIRAKOVÁ et al., 2007). No entanto, a mais atual definição e, também, a mais completa, considera todos os microrganismos cultiváveis ou não, que habitam o interior dos vegetais, sem causar danos à planta e que não desenvolvem

estruturas externas, ou seja, excluindo bactérias de nódulos de raízes e fungos micorrízicos (AZEVEDO, 2014).

Os fungos endofíticos podem habitar todas as partes da planta, como folhas, estruturas reprodutivas, pecíolos, galhos, cascas e raízes (FAETH, 2002; RODRIGUEZ et al., 2009), sendo que a maioria desses fungos pertence ao Filo Ascomycota, no entanto, foi demonstrada a existência de representantes do Filo Basidiomycota em alguns trabalhos desenvolvidos (ARNOLD; LUTZONI, 2007; HYDE; SOYTONG, 2008; RAJAMANIKYAM et al., 2017).

Rodriguez et al. (2009) propôs uma organização dos fungos endofíticos em quatro classes. Apesar dos fungos micorrízicos também serem endofíticos, muitos autores os consideram em um grupo separado por ser uma simbiose altamente especializada e bem caracterizada, sendo que os fungos micorrízicos arbusculares (MA) não estão incluídos nesta classificação.

A Classe 1 é formada pelos fungos clavicipitáceos, os quais representam um pequeno número de espécies que provocam infecções em gramíneas, e pelos fungos não-clavicipitáceos que são bem diversos. Fungos dessa classe são caracterizados por aumentar a biomassa vegetal, conferir tolerância à seca, produzir produtos químicos que são tóxicos para animais, diminuindo a herbivoria, no entanto, esses benefícios conferidos por esses fungos dependem do genótipo do hospedeiro e condições ambientais (MALINOWSKI et al., 2000; FAETH et al., 2006).

A Classe 2 é formada principalmente por fungos integrantes do Filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, sendo que também são encontrados representantes do Filo Basidiomycota, Subfilo Agaricomycota e Pucciniomycotina. Esses fungos podem crescer acima do solo e abaixo dos tecidos e podem conferir tolerância específica ao estresse no habitat do hospedeiro. Apresentam alta taxa de infecção em ambientes estressantes e sua transmissão pode ocorrer tanto horizontalmente quanto verticalmente. Um exemplo de tolerância específica é dado pela relação simbiótica entre a planta *Dichanthelium lanuginosum* e o fungo *Curvularia protuberata*, enquanto ambos estão associados simbioticamente podem tolerar temperaturas de até 65 °C, mas isoladamente, não toleram temperaturas acima de 40 °C (Marquez et al., 2007).

A Classe 3 é formada por fungos que infectam tecidos aéreos e que possuem colonização localizada. A maioria é representada por integrantes do Filo Ascomycota e

Basidiomycota, sendo que uma maior diversidade pode ser encontrada em ambientes tropicais (ARNOLD e LUTZONI, 2007). Podem estar associados a diversos tecidos acima do solo, tanto de plantas vasculares quanto de plantas não vasculares.

A Classe 4 é formada por fungos septados negros que colonizam tecidos da raiz de forma extensiva (RODRIGUEZ et al., 2009). Os principais representantes pertencem ao Filo Ascomycota e produzem melanina, formando estruturas chamadas microesclerócitos nas raízes das plantas hospedeiras. Geralmente, esses fungos não apresentam especificidade de hospedeiro e constituem os fungos mais abundantemente encontrados em associação com raízes de plantas (MANDYAM e JUMPPONEN, 2005; AVESKAMP et al., 2009).

Os fungos filamentosos são os mais comumente isolados de estruturas vegetais (GUNATILAKA, 2006). De forma geral, esses fungos não produzem sintomas de doenças no hospedeiro, podendo estar latentes ou serem assintomáticos, sendo essas interações conhecidas como neutras (SCHULZ e BOYLE, 2005; STROBEL e DAISY, 2003). Nessas associações mutualísticas, a convivência entre o fungo e a planta é pacífica, sendo que os dois organismos sobrevivem de forma assintomática, ambos sendo beneficiados (SHAHABIVAND et al., 2017).

Um dos principais mecanismos pelos quais o fungo beneficia a planta é através da produção de metabólitos secundários (SCHULZ et al., 1995). Nesses casos, pode-se dizer que existe mutualismo defensivo, ou seja, o fungo endofítico está dando proteção à planta e, desse modo, estará protegendo a si próprio. A natureza assintomática da ocupação por fungos no tecido de plantas pode nos conduzir à classificação de um relacionamento simbiótico entre os dois, mas a diversidade de fungos endofíticos nos diz que estes possam ser sapróbios ou patógenos oportunistas (CLAY, 1988; STROBEL e DAISY, 2003; RAJAMANIKYAM et al., 2017).

Existe discussão acerca da interação entre fungos e plantas, pois diferentes autores caracterizam a distinção entre fungos endofíticos como simplesmente didática. Assim sendo, pode-se dizer que existe um gradiente entre os grupos e não uma clara distinção ou limite entre os grupos desses organismos endofitos (SAIKKONEN et al., 1998; AZEVEDO, 1999).

De acordo com Saikkonen et al. (2004), a relação dos fungos endofíticos com o vegetal hospedeiro é um tanto complexa, pois envolve interações entre as espécies e também está sob a influência de fatores abióticos e bióticos. Dependendo das condições do ambiente, um

fungo endofítico pode tornar-se patogênico. Também, essa patogenicidade pode ser despertada pelo desequilíbrio em relação a outros endofíticos. Outro exemplo que convém ser destacado é o caso de fungos epifíticos que podem, eventualmente, penetrar em uma planta, causando ou não danos à mesma por determinado período. Estudos mostram que a mudança da interação de mutualismo para patogenicidade entre fungo *Epichloe festucae* e planta pode ser mediada pela ativação ou inativação de um gene específico, o NoxA. Logo, pode-se dizer que as intrincadas interações mutualísticas entre fungos endofíticos e planta hospedeira são reguladas a nível ambiental, genético e fisiológico, resultando nos benefícios de adaptabilidade para ambos os envolvidos (SAIKKONEN et al., 1998; AZEVEDO, 1999).

Os fungos endofíticos mais estudados são os que estabelecem associações com espécies de gramíneas, pois eles são agronomicamente importantes devido a sua produção de metabólitos secundários e potencial contra herbivoria, por exemplo (SAIKKONEN et al., 1998). Saikkonen et al., 1998 mostraram que aproximadamente 75% das descrições que abordam aspectos ecológicos ou evolucionários de associações de endofíticos e plantas tratam de relações entre gramas e seus endófitos. Por meio desses números pode-se perceber a necessidade de estudos associados a outros grupos de plantas, tendo em vista uma abordagem mais ecológica para esses casos.

2.2. Metais Pesados

Um dos grupos de poluentes que causam preocupação, não só pela sua toxicidade como também pela elevada mobilidade nos compartimentos ambientais, como solo, água e sedimentos, é o grupo dos metais pesados. De acordo com Malavolta (1994), metais pesados são elementos que tem densidade maior que 5 g/cm^3 ou que possuem número atômico superior a 20, como arsênio, cádmio, chumbo, cromo, mercúrio e zinco, sendo conhecidos também como elementos traço ou metais traço, apesar de não existir consenso ou definição precisa para o termo. É um termo amplamente aplicado para elementos tais como arsênio (As), cádmio (Cd), cobre (Cu), mercúrio (Hg), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn), que são comumente associados a problemas de contaminação ambiental. No entanto, alguns metalóides como

Arsênio, que possuem densidades menores, são incluídos no grupo dos metais pesados devido aos seus efeitos tóxicos no meio ambiente (MENESES, 2008; KHALID et al., 2017).

Os metais pesados estão presentes em todo o território ambiental e estão muitas vezes presentes em níveis baixos. Em quantidades maiores, entretanto, podem ser perigosos para a vida em geral. Esses elementos traço ocorrem de forma natural nos solos (FADIGAS et al., 2010), no entanto, nas últimas décadas, atividades humanas passaram a elevar, de forma desenfreada, a concentração de muitos destes metais em diversos ecossistemas (KABATA-PENDIAS, 2011).

Os metais pesados possuem origens litogênicas e antropogênicas, sendo as primeiras relacionadas às fontes geológicas, como resíduos de rochas e processo de intemperismo, indicando que esse teor natural pode estar relacionado ao material de origem. As fontes antropogênicas relacionam com as atividades humanas e podem atingir teores elevados, comprometendo a qualidade ambiental. Por exemplo, resíduos agrícolas ou produtos para correção da acidez do solo, assim como fertilizantes para uso agrícola também podem ser fonte de boa parte da contaminação dos ambientes naturais (SANTOS et al., 2015).

São variadas as formas pelas quais os metais pesados podem chegar ao ambiente, dentre elas, o despejo de lixo a céu aberto e aterros sanitários que não seguem as normas adequadas para despejo de material sólido. Se o produto final da decomposição desses resíduos sólidos contém alta concentração de metais pesados, o chorume líquido gerado pode ser nocivo para o solo, água, vegetais e animais. Uma vez que os metais pesados são absorvidos por plantas, ocorre a acumulação sucessiva em tecidos animais, ou seja, a bioacumulação através da cadeia alimentar que faz com que saúde do meio ambiente e, conseqüentemente, dos seres humanos, esteja em risco (WONG et al., 2006; MISHRA et al., 2017).

Além disso, os metais pesados permanecem no ecossistema em concentrações de risco por um longo período, sobretudo nos sedimentos (LARCHER 2000, SIEGEL 2002). Entretanto, a ocorrência de metais pesados em altas concentrações em certos tipos de ambientes e as implicações ecológicas disso, do ponto de vista ecológico evolutivas, é um fenômeno pouco estudado (AL-MUR; QUICKSALL; AL-ANSARI, 2017).

O solo é o principal reservatório de metais pesados (CAO et al., 2010), ocorrendo naturalmente em concentrações variáveis, de acordo com os fatores abióticos e bióticos, como presença de matéria orgânica, o pH e o conteúdo e tipo de solo, uma vez que argilas tem grande

poder de sorção desses elementos. Estes fatores, em conjunto, interferem no acúmulo destes elementos traço no solo e definem suas distribuições espaciais (HOODA, 2010; CAMPOS, 2010; KABATA-PENDIAS, 2011; KHALID et al., 2017).

No que diz respeito aos sedimentos, estes são considerados o compartimento mais significativo quanto à acumulação de metais pesados, sendo um reconhecido indicador ambiental da poluição da água, uma vez que possuem a capacidade de acumular, transportar e liberar contaminantes que se encontravam ligadas às partículas (CHABUKDHARA e NEMA, 2012). A liberação destes ocorre devido a alterações físico-químicas no ambiente, podendo contaminar a água e outros sistemas ambientais, afetando a qualidade de outros compartimentos, levando à bioacumulação e biomagnificação (COTTA et al., 2006). Assim, uma vez contaminados, os sedimentos podem representar uma fonte potencial de metais pesados para o ambiente, mesmo após a redução ou a eliminação das emissões por meio dos efluentes industriais, lixões e aterros, por exemplo (RIBEIRO et al., 2013).

Alguns metais pesados, como Fe, Zn, Ca e Mg foram relatados como sendo de importância para a vida no geral em pequenas quantidades. BERTON (2000) destaca que os metais Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn, são essenciais às plantas, o Co às bactérias fixadoras de nitrogênio e o Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn, aos animais. No entanto, alguns outros metais, como As, Cd, Pb e formas metiladas de Hg não apresentam nenhuma importância para a fisiologia, e até mesmo em concentrações muito baixas podem ser tóxicos (DURUIBE et al., 2007). Dessa forma, metais pesados exercem efeitos tóxicos em microrganismos do solo, resultando em uma mudança da diversidade e tamanho de populações e comunidades microbianas (NARENDRULA-KOTHA; NKONGOLO, 2017).

Em adição, elevações da concentração de Pb em solos podem diminuir a produtividade e até mesmo ínfimas quantidades de Pb chegam a inibir processos fotossintéticos essenciais em plantas, assim como influenciar negativamente a divisão celular e absorção de água pelas raízes, com sintomas característicos, a presença de folhas escurecidas e encurtamento de raízes (BHATTACHARYYA et al., 2008).

A contaminação por metais pesados no ambiente tem atraído à atenção mundial devido à sua abundância, persistência e toxicidade ambiental (ISLAM et al., 2015). A remediação desses ambientes contaminados pode ser alcançada por meio de vários métodos

ainda pouco eficientes como a remoção desses íons por meio da utilização de diferentes tipos de argilas (ABDELLAOUI et al., 2017). Uma das estratégias mais acessíveis de reabilitação dessas áreas é a fitorremediação, que consiste no plantio de certas espécies de plantas no solo mediante diferentes técnicas como a fitoestabilização. Na fitoestabilização utilizam-se plantas e agentes como calcário, para promover a remoção e imobilização, tornando os contaminantes menos nocivos ao ecossistema. Um dos passos iniciais para o processo de fitorremediação é encontrar plantas tolerantes a esses contaminantes (ADEDIRAN et al., 2015; KHALID et al., 2017).

2.3. Fungos Endofíticos Tolerantes a Metais Pesados

Alguns metais pesados desempenham um importante papel em reações bioquímicas significantes para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, plantas e animais (KAVAMURA; ESPOSITO, 2010). Contudo, quando presentes em concentrações excessivas, eles podem formar compostos que possuem efeitos citotóxicos. Metais como cério, gálio e tório, por exemplo, não possuem nenhum papel biológico. Ferro e manganês são importantes micronutrientes e tem baixa toxicidade. Por outro lado, cobalto, cobre, cromo, vanádio e zinco, por exemplo, pertencem ao micronutrientes essenciais, mas são considerados tóxicos. Por fim, antimônio, arsênico, cádmio, chumbo, mercúrio e prata são extremamente tóxicos (MAHBUB et al., 2017).

Dentre os organismos de solo, os fungos possuem alta resistência à poluição por metais pesados (NARENDRULA-KOTHA; NKONGOLO, 2017), e desempenham importantes funções no ciclo dos elementos, transformações minerais e interações simbióticas (GADD, 2007). Por outro lado, a comunidade microbiológica de folhas contém uma grande variedade de organismos, incluindo epífitos nas superfícies dessas folhas (KINKEL, 1991), endófitos vivendo internamente e assintomaticamente, assim como organismos patógenos (WILSON, 1995). Essa comunidade de fungos é dinâmica e diversa tanto no tempo quanto no espaço e é regulada pelas condições ambientais (KINKEL, 1991; BOURCERET, et al., 2015).

Sendo assim, elevadas concentrações de metais pesados e outros poluentes afetam qualitativamente e quantitativamente a composição dessas comunidades (GADD, 1993). Por exemplo, poluentes metálicos diminuem a densidade de fungos endofíticos de bétulas no ambiente (HELANDER et al., 1993), assim como podem diminuir a diversidade, inibir o

crescimento e causar mudanças na fisiologia e morfologia (EZZOUHRI et al., 2009), e possivelmente agem como um agentes seletivos para a emergência de tipos de fungos resistentes a metais pesados (RANTA; NEUVONEN, 1994; HELANDER, 1995; GURURAJAN; PRASANNA, 2017).

Mecanismos de sobrevivência sob estresse por metais pesados pode ser uma estratégia complexa. Alguns fungos considerados excepcionais possuem a habilidade de sobreviver e acumular esses metais sob condições que são letais para outros organismos (ZAPOTOCZNY et al., 2007). Os mecanismos de sobrevivência de certos fungos incluem, por exemplo, a redução da captação de metais, efluxo incrementado e imobilização de metais, biossorção pela parede celular, ligação extracelular por polissacarídeos e sequestro intracelular por metalotioneínas e fitoquelatinas, localização vacuolar, entre outros (COLLIN-HANSEN et al., 2005; GADD, 2007).

Diretamente ou indiretamente, esse tipo de organismo pode utilizar diferentes estratégias de sobrevivência, por exemplo, por meio da síntese de c-glutamil peptídeos, ligação do cobre ou precipitação do mesmo ao redor da parede celular com transporte intracelular, os quais são mecanismos de resistência de *Saccharomyces cerevisiae* ao excesso de Cu^{2+} (GADD e WHITE, 1989). Contudo, a aclimatização ao estresse é realizada através de mecanismos intrincados e diversos, inclusive envolvendo múltiplos caminhos fisiológicos e metabólicos complexos ainda pouco estudados (FAZLI et al., 2015; ZHAO; LI; SHEN, 2015; HOQUE; FRITSCHER, 2016).

Outros complexos mecanismos envolvem a formação de precipitados extracelulares, complexações, cristalizações e transformações de metais (WHITE et al., 1997), diminuição do transporte, compartimentação intracelular, incremento da impermeabilidade e sistema de extrusão de substâncias tóxicas (BRUINS et al., 2000; ZAFAR et al., 2007). Por exemplo, de acordo com estudos, *Neurospora crassa* apresentou uma taxa de reforço de 25 % de parede celular na presença de cádmio, comparado ao controle (BHANOORI e VENKATESWERLU, 2000). Martino et al. (2000) mostraram que fungos ericoides micorrízicos secretam e depositam melanina na parede celular como resposta aos estresses causados por metais pesados no meio.

Os mecanismos de tolerância de certos fungos tem atraído o interesse de estudiosos para a capacidade de biorremediação que esses fungos possuem. A biomassa dos fungos possui grande quantidade de material na parede celular e este material é um ligante de metais excelente

(SRIVASTAVA et al., 2007). Certas espécies de fungos, tais como *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus niger*, apresentam capacidade de sequestrar poluentes orgânicos, por exemplo, o hidroxilbenzeno (FOUNTOULAKIS et al., 2002; HAI et al., 2006; SANTAELLA et al., 2009; PASSOS et al., 2009) e os metais pesados (LIU et al., 2006), por meio de atividades do metabolismo, pela ativação da produção de enzimas e processos de bioabsorção (ZHAO; LI; SHEN, 2015).

Espécies fúngicas, tais como *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Trichoderma viride*, *T. atroviride* têm sido usados para remoção de metais em despejos de efluentes sintéticos (YIN et al., 1999; ERRASQUÍN e VÁZQUEZ, 2003; PORCEL, et al., 2005; MUKHOPADHYAY, et al., 2007). Além disso, os componentes da parede celular desempenharam um papel crítico na adsorção de íons de resíduos em fungos como *Flamuvolina velutipes*, *Auricularia polytricha*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatus*. Devido à essa crescente utilização do tratamento biológico de águas residuais, tanto pelo baixo custo quanto pela boa acessibilidade, torna-se notória a necessidade do estudo da toxicidade de metais sobre a diversidade microbiana em ambientes de sistemas de tratamento (LI et al., 2017).

2.4. Fungos Endofíticos e sua Influência na Tolerância de Plantas a Metais Pesados

Estudos mostram que a contaminação do solo com metais pesados tem uma influência negativa no desenvolvimento de plantas (BONANNO; BORG; MARTINO, 2017). Uma grande sensibilidade pode ser encontrada nos citros, espinafre e em uma ampla variedade de fabáceas, uma vez que a fitotoxicidade pelo excesso de metais é causada através do distúrbio dos processos fisiológicos devido a desordens na absorção de nutrientes que são necessários para o funcionamento apropriado dessas plantas (WYSZKOWSKI; WYSZKOWSKA, 2009; NADGÓRSKA-SOCHA et al., 2013; TRAN; POPOVA, 2013; SHAHABIVAND et al., 2017).

Plantas cultivadas em solos com elevada concentração de metais pesados podem sofrer com a inibição do crescimento, transpiração reduzida, clorose de folhas, limitações da germinação de sementes e deformidades no sistema radicular, sendo que esses efeitos são mais fortes nos estágios iniciais de desenvolvimento dessas plantas (NADGÓRSKA-SOCHA et al., 2013; TRAN e POPOVA, 2013).

A mobilidade e disponibilidade de metais pesados para plantas depende do pH do solo, quantidade de matéria orgânica, granulometria, quantidade de óxidos de manganês, capacidade de sorção do solo e tipo do metal, entre outros. De forma geral, metais pesados estão mais disponíveis para plantas em solos com alto nível de ácidos húmicos (PIERANGELI et al. 2001; KABATA-PENDIAS, 2011; TRAN e POPOVA, 2013; ANTONIADIS et al., 2017).

Em ambiente natural, muitas plantas estabelecem associações com fungos para formar complexas simbioses. Alguns estudos provam que esses fungos podem tolerar altos níveis de metais pesados e acumular esses metais nos tecidos miceliais, ou seja, protegendo as plantas hospedeiras da contaminação por esses elementos tóxicos (LEYVAL et al., 1997; COLPAERT et al., 2000; SHAHABIVAND et al., 2017; BAN et al., 2017).

Muitos desses fungos têm a habilidades de reduzir o estresse causado por metais pesados em plantas e estimular o crescimento vegetal (SHIN et al., 2012; HE et al., 2013). Dentre essas habilidades, fungos mostram excelente capacidade de ligação a metais (GADD, 1990) e concedem algumas vantagens comparadas aos benefícios de bactérias em raízes de plantas (D'ANNIBALE et al., 2006). Os fungos possuem propriedades que influenciam a diminuição da toxicidade de metais, incluindo a formação da ligação metal-proteína, precipitações orgânicas e inorgânicas, transporte ativo, compartimentação intracelular, enquanto que os constituintes da parede celular do fungo, como a quitina, possuem capacidade de adsorver metais (GADD et al., 2001), tais mecanismos evidenciam a importância do uso desses fungos em associação com plantas para remediação ambiental.

O fungo endofítico *Piriformospora indica* coloniza o interior de várias espécies vegetais e promove crescimento celular e resistência contra fatores estressantes abióticos e bióticos, resultando em um grande incremento na biomassa vegetal (UNNIKUMAR et al., 2013; VARMA, 2013; SHAHABIVAND et al., 2017). Outro fungo endofítico bem estudado faz parte do gênero *Neotyphodium*, o qual pode afetar a captação e transporte de minerais em plantas de *Festuca arundinacea* (RAHMAN e SAIGA 2005; MALINOWSKI et al., 2000). Em *Zea mays*, o fungo *Gaeumannomyces cylindrosporus* incrementou as taxas fotossintéticas e diminuiu a translocação de Pb dessas plantas (BAN et al., 2017).

Apesar de fungos endofíticos aumentarem a tolerância de certas plantas a metais pesados, Ren et al. (2006) mostrou que *Lolium* sp. infectados com endófitos acumulam mais

cádmio do que plantas não infectadas, mas isso não significa uma maior toxicidade para a planta. Sendo assim, as interações entre o endófito *Neotyphodium* e as plantas hospedeiras são complexas e podem variar de mutualísticas a parasíticas, dependendo das condições nas quais eles estão crescendo (MALINOWSKI e BELESKY, 2006). Similarmente a micorrizas, *Neotyphodium* interage mutualisticamente com gramas e garante tolerância a alumínio (MALINOWSKI e BELESKY, 1999), zinco (MONNET et al., 2001) e cobre (MALINOWSKI et al., 2004).

Diferentemente dos fungos micorrízicos arbusculares, os fungos endofíticos podem ser encontrados colonizando tecidos de várias plantas, muitas vezes independentemente da taxonomia e preferências ambientais (SCHULZ e BOYLE 2006). Além disso, fungos endofíticos são de particular interesse, pois eles possuem a vantagem de serem relativamente protegidos do competitivo e estressante ambiente do solo (RODRIGUEZ et al. 2008; LI et al. 2011).

Muitos fungos como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e fungos micorrízicos arbusculares (AMF) tem mostrado seu potencial em relação à remoção de contaminantes do solo, incrementando a fitorremediação (ADAMS et al., 2007; LEBEAU et al., 2008). Desses, AMF associados a plantas tem sido muito estudados pelas suas potencialidades de fitorremediação (MARQUES et al., 2006). Similarmente, muitos fungos endofíticos resistentes a metais pesados, especialmente os endófitos septados negros (DSEs), tem mostrado grande potencial de bio-sorção para o tratamento de áreas contaminadas por metais pesados em associação a plantas, pois incrementam o crescimento desses vegetais e promovem a bio-sorção de metais concomitantemente (LUO et al., 2010; LI et al., 2011, 2012; DENG et al., 2014).

Muitas tentativas têm sido feitas para o tratamento de ambientes sob contaminação por metais pesados, como tratamento eletroquímico, troca iônica, precipitação, osmose reversa, evaporação e sorção (KADIRVELU et al., 2002; LUO et al., 2010; KHALID et al., 2017). No entanto, esses métodos são caros e pouco efetivos, além de não removerem os metais completamente e produzirem resíduos tóxicos (HEMAMBIKA et al., 2011). Biorremediação, por outro lado, oferece uma promissora e econômica opção para o tratamento de ambientes contaminados por esses metais (ISKANDAR et al., 2011). O estudo sobre o uso de espécies vegetais de grande porte para a biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados tem ganhado destaque por causa da maior imobilização destes na biomassa vegetal por períodos mais

longos, uma vez que produzem grande quantidade de biomassa (ELTROP et al., 1991; ANTONIADIS et al., 2017).

Por outro lado, estudos evidenciam que as plantas herbáceas que apresentam baixa produção de biomassa possuem maior tolerância ao excesso de metais no solo do que as arbóreas. No entanto, muitas plantas consideradas hiperacumuladoras de metais não são adequadas para aplicações de fitorremediação em campo por causa de problemas críticos, como baixa taxa de crescimento e pouca biomassa, baixa faixa de tolerância, variável biodisponibilidade dos contaminantes para essas plantas, entre outros fatores (GERHARDT et al., 2009; GLICK, 2010; OJUEDERIE; BABALOLA, 2017). Para superar esses problemas, o incremento da tolerância concedido pelos fungos endofíticos pode ser explorado (RAJKUMAR et al., 2012), uma vez que alguns fungos nativos tem uma marcante adaptação a metais pesados quando sob constante estresse causado por esses metais. Além disso, os metais tóxicos podem até mesmo ser usados como micronutrientes por esses organismos endofíticos. Portanto, pode ser de grande importância a inoculação desses fungos em plantas para o incremento da fitorremediação em solos contaminados por metais tóxicos (DODD e THOMPSON, 1994; ZHANG et al., 2008).

Logo, a questão chave é que as plantas aplicadas para fitorremediação devem ter a habilidade de tolerar poluentes. Dessa forma, níveis tóxicos de metais podem possibilitar o crescimento vegetal por meio do incremento da tolerância concedida por fungos, o que aumenta a eficiência dos processos de fitorremediação (ALKORTA et al., 2004; KHAN et al., 2017). Nesse contexto, nota-se que as respostas a fatores abióticos, como estresse causado por metais, têm sido intensivamente estudadas, mas não são levadas em consideração as interações simbióticas entre plantas e fungos endofíticos, uma vez que esses fungos simbiotes podem ter efeitos notáveis sobre a ecologia vegetal, resistência e evolução, moldando as comunidades vegetais (CLAY e HOLAH, 1999) e manifestando fortes efeitos sobre a estrutura das comunidades e diversidade de organismos associados, como bactérias, nematoides e insetos (OMACINI et al., 2001; MAHBUB et al., 2017).

Sendo assim, a investigação das adaptações das plantas e fungos a estes elementos metálicos isoladamente, em combinação com estudos das intrincadas relações entre fungos endofíticos e vegetais, pode revelar aspectos importantes para o manejo destes poluentes em

ambientes antropizados. Podendo assim subsidiar ações, manejos e políticas públicas com o intuito de prevenir e mitigar os efeitos desses metais nas populações.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Conhecer a diversidade e a tolerância de fungos associados a plantas fanerógamas lenhosas sujeitas a contaminação por metais pesados no estado do MA.

3.2. Objetivos Específicos

- Coletar e identificar espécies de plantas fanerógamas lenhosas da margem do Igarapé do Sabino, Bacia do Rio Tibiri, São Luís, Maranhão;
- Isolar, purificar, identificar e preservar colônias fúngicas associadas às folhas das plantas coletadas através de metodologia específica;
- Identificar dentre os fungos mais prevalentes, possíveis espécies tolerantes e/ou resistentes ao metal pesado Hg através de ensaios *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELLAOUI, Y. et al. Comparison of the divalent heavy metals (Pb, Cu and Cd) adsorption behavior by montmorillonite-KSF and their calcium- and sodium-forms. **Superlattices And Microstructures**, p.1-51, dez. 2017.

ABUBAKARI, M. et al. Heavy metals concentrations and risk assessment of roselle and jute mallow cultivated with three compost types. **Annals Of Agricultural Sciences**, p.1-6, dez. 2017.

ADEDIRAN, G.A. et al. Mechanisms behind bacteria induced plant growth promotion and Zn accumulation in *Brassica juncea*. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 283, p.490-499, fev. 2015.

- ADAMS, P.; DE-LEIJ, F. A. A. M.; LYNCH, J. M. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 Mediates Growth Promotion of Crack Willow *Salix fragilis* Saplings in Both Clean and Metal-Contaminated Soil. **Microb Ecol**, Surrey, v. 54, n. 2, p.306-313, 2007.
- ALI, A.H. et al. Effect of *Thermomyces* fungal endophyte isolated from extreme hot desert-adapted plant on heat stress tolerance of cucumber. **Applied Soil Ecology**, p.1-8, nov. 2017.
- ALKORTA, I. et al. Recent Findings on the Phytoremediation of Soils Contaminated with Environmentally Toxic Heavy Metals and Metalloids Such as Zinc, Cadmium, Lead, and Arsenic. **Reviews In Environmental Science And Biotechnology**, Spain, v. 3, n. 1, p.71-90, 2004.
- AL-MUR, Bandar A.; QUICKSALL, Andrew N.; AL-ANSARI, Ahmed M.A. Spatial and temporal distribution of heavy metals in coastal core sediments from the Red Sea, Saudi Arabia. **Oceanologia**, v. 59, n. 3, p.262-270, jul. 2017.
- ANTONIADIS, V. et al. Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. **Earth-science Reviews**, v. 171, p.621-645, ago. 2017.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and Host Range of Foliar Fungal Endophytes: Are Tropical Leaves Biodiversity Hotspots?. **Ecology**, v. 88, n. 3, p.541-549, 2007.
- ARAI, T.; OHJI, M.; HIRATA, T.. Trace Metal Deposition in Teleost Fish Otolith as an Environmental Indicator. **Water Air Soil Pollut**, v. 179, n. 1-4, p.255-263, 2006.
- AVESKAMP, M. M. et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of Phomasection *Peyronellaea* and multiple taxonomic novel-ties. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, n. 3, p.363-382, 2009.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. **Microbial Diversity And Biotechnology In Food Security**, p.17-22, 2014.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, p.225-229, 1999.
- BAKER, A.J.M.; MCGRATH, S.P.; SIDOLI, C.M.D. REEVES, R.D. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. Resources, **Conservation And Recycling**, Amsterdam, v. 11, n. 1-4, p.41-49, 1994.
- BAKER, A. J. M. Metal Tolerance. **New Phytologist**, London, v. 106, p.93-111, 2008.
- BAN, YIHUI; XU, ZHOUYING; YANG, YURONG. Effect of Dark Septate Endophytic Fungus *Gaeumannomyces cylindrosporus* on Plant Growth, Photosynthesis and Pb Tolerance of Maize (*Zea mays* L.). **Pedosphere**, v. 27, n. 2, p.283-292, abr. 2017.
- BANERJEE, Debdulal. Endophytic Fungal Diversity in Tropical and Subtropical Plants. **Research Journal Of Microbiology**, v. 6, n. 1, p.54-62, 1 jan. 2011.

BERTON, R S. Riscos de contaminação do agrossistema com metais pesados. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 259-268.

BHATTACHARYYA, P. et al. Fractionation and bioavailability of Pb in municipal solid waste compost and Pb uptake by rice straw and grain under submerged condition in amended soil. **Geosciences Journal**, India, v. 12, n. 1, p.41-45, 2008.

BHANOORI, M.; VENKATESWERLU, G. In vivo chitin–cadmium complexation in cell wall of *Neurospora crassa*. **Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects**, Hyderabad, v. 1523, n. 1, p.21-28, 2000.

BONANNO, Giuseppe; BORG, Joseph A.; MARTINO, Vincenzo di. Levels of heavy metals in wetland and marine vascular plants and their biomonitoring potential: A comparative assessment. **Science Of The Total Environment**, v. 576, p.796-806, jan. 2017.

BOTERO, Carlos A.; DOR, Roi; MCCAIN, Christy M.. Environmental harshness is positively correlated with intraspecific divergence in mammals and birds. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 2, p.259-268, 27 nov. 2013.

BOURCERET, Amélia et al. The Bacterial and Fungal Diversity of an Aged PAH- and Heavy Metal-Contaminated Soil is Affected by Plant Cover and Edaphic Parameters. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 3, p.711-724, 6 out. 2015.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial Resistance to Metals in the Environment. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, Manhattan, v. 45, n. 3, p.198-207, 2000.

SANTOS, N. M.; NASCIMENTO, C. W. A.; ACCIOLY, A. M. Distribuição espacial de metais pesados em solos do entorno da baía de Todos os Santos - BA. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2015.

CAMPOS, A.E.C.; NUNES, G.S.; DE OLIVEIRA, J.C.S. Avaliação da contaminação do Igarapé do Sabino (Bacia do Rio Tibiri) por metais pesados, originados dos resíduos e efluentes do Aterro da Ribeira, em São Luís, Maranhão. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p.960-964, 2009.

CANNON, P.F., SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v. 94, p. 210–220, 2002.

CARROL, G. **The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials**: Microbiology of the phylloplane. London: Cambridge University Press, 1986. 729 p.

CAMPOS, M. C. C. Atributos dos solos e riscos de lixiviação de metais pesados em solos tropicais. **Ambiência**, Centro-Oeste, v. 6, n. 3, p.547-565, 2010.

CHABUKDHARA, M.; NEMA, A. K. Assessment of heavy metal contamination in Hindon River sediments: A chemometric and geochemical approach. **Chemosphere**, New Delhi, v. 87, n. 8, p.945-953, 2012.

- COLLIN-HANSEN, C.; ANDERSEN, R. A.; STEINNES, E. Molecular defense systems are expressed in the king bolete (*Boletus edulis*) growing near metal smelters. **Mycologia**, Trondheim, v. 97, n. 5, p.973-983, 2005.
- COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; PIOVANI, M. R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira: PETAR, São Paulo, Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p.40-45, 2006.
- CLAY, K. Fungal Endophyte Symbiosis and Plant Diversity in Successional Fields. **Science**, Bloomington, v. 285, n. 5434, p.1742-1744, 1999.
- COLPAERT, J. V. et al. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. **New Phytologist**, Leuven, v. 147, n. 2, p.367-379, 2000.
- CLAY, K. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism.. In: PIROZYNSKI, K. A. **Coevolution of fungi with plants and animals**. San Diego: Academic Press, 1988. p. 79-105.
- D'ANNIBALE, A; ROSETTO, F.; LEONARDI, V.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLLI, M. Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. **Applied And Environmental Microbiology**, Venezia, v. 72, n. 1, p.28-36, 2006.
- DENG, Z.j. et al. Characterization of Cd-, Pb-, Zn resistant endophytic sp. MXSF31 from metal accumulating and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils. **Environ Sci Pollut Res**, Guangzhou, v. 21, p.2346-2357, 2014.
- DODD, J.C.; THOMPSON, B.D. The screening and selection of inoculant arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. **Plant And Soil**, Canterbury, v. 159, n. 1, p.149-158, 1994.
- DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M.O.C.; EGWURUGWU, J.N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal Of Physical Sciences**, India, v. 2, n. 5, p.112-118, 2007.
- ELTROP, L.; BROWN, G.; JOACHIM, O.; BRINKMANN, K. Lead tolerance of *Betula* and *Salix* in the mining area of Mechernich/Germany. **Plant Soil**, Germany, v. 131, n. 2, p.275-285, 1991.
- ERRASQUÉN, L.E.; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. **Chemosphere**, Madrid, v. 50, n. 1, p.137-143, 2003.
- EZZOUHRI, L.; CASTRO, E.; MOYA, M.; ESPINOLA, F.; LAIRINI, K. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. **African Journal Of Microbiology Research**, Africa, v. 3, n. 2, p.35-48, 2009.
- FAETH, S. H. Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists. **Integrative And Comparative Biology**, Tempe, v. 42, n. 2, p.360-368, 2002.

- FAETH, S.H. et al. Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, p. 307–324, 2006.
- FADIGAS, F. S.; DO AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; CUNHA DOS ANJOS, L.H.; MAZUR, N. Background levels of some trace elements in weathered soils from the Brazilian Northern region. **Sci. Agric.** (piracicaba, Braz.), Piracicaba, v. 67, n. 1, p.53-59, 2010.
- FAZLI, M. M.; SOLEIMANI, N.; MEHRASBI, M. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. **Journal Of Environmental Health Science And Engineering**, v. 13, n. 1, p.1-9, 14 mar. 2015.
- FIRÁKOVÁ, S.; TURDÍKOVÁ, M.; MĚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v. 62, n. 3, p.251-257, 2007.
- FOUNTOULAKIS, M.S. et al. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Water Research**, Patras, v. 36, n. 19, p.4735-4744, 2002.
- GADD, G. M.. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, Dundee, v. 111, n. 1, p.3-49, 2007.
- GADD, G. M.; WHITE, C. Removal of thorium from simulated acid process streams by fungal biomass. **Biotechnol. Bioeng.**, Dundee, v. 33, n. 5, p.592-597, 1989.
- GURURAJAN, K. B. PRASANNA D. Screening and selection of indigenous metal tolerant fungal isolates for heavy metal removal. **Environmental Technology & Innovation**, p.1-17, 2017.
- GUIMARÃES, A.C. **Estudo químico e biológico de *Cladocolea micrantha*, uma planta medicinal da região amazônica**. 2005. 330 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- GADD, G.M. Fungi and yeast metal accumulation. In: EHRLICH, H.L. **Ehrlich H.L., Brierley C.L.** New York: Mcgraw-hill, 1990. p. 249-276.
- GADD, G. M. Interactions of Fungi with Toxic Metals. **New Phytol**, Dundee, v. 124, n. 1, p.25-60, 1993.
- GADD, G. M.; RAMSAY, L.; CRAWFORD, J.W.; RITZ, K. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. **Fems Microbiology Letters**, Dundee, v. 204, n. 2, p.311-316, 2001.
- GERHARDT, K. E.; HUANG, X.; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. **Plant Science**, Waterloo, v. 176, n. 1, p.20-30, 2009.
- GLICK, B. R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 28, n. 3, p.367-374, 2010.

- HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, Canada, v. 43, n. 10, p.895-914, 1997.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n.1, 9p. 2001.
- HOODA, P. S. **Trace elements in soils**. Wiley-blackwell: Wiley, 2010. 618 p.
- HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, Thailand, v. 33, n. 1, p.163-173, 2008.
- HE, H.; YE, Z.; YAN, D.; YAN, J.; XIAO, L.; ZHONG, T.; YUAN, M.; CAI, X, FANG, Z.; JING, Y. Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. **Chemosphere, Guangzhou**, v. 90, n. 6, p.1960-1965, 2013.
- HELANDER, M. L. Responses of pine needle endophytes to air pollution. **New Phytologist**, Turku, v. 131, n. 2, p.223-229, 1995.
- HELANDER, M.L. et al, O. Simulated acid rain affects birch leaf endophyte populations. **Microb Ecol**, Turku, v. 26, n. 3, p.227-234, 1993.
- HEMAMBIKA, B.; JOHNCY, R. M.; KANNAN, V. R. Biosorption of heavy metals by immobilized and deadfungal cells: a comparative assessment. **J Ecol Nat Environ**, Maharashtra, v. 3, n. 5, p.168-175, 2011.
- HOQUE, Enamul; FRITSCHER, Johannes. A new mercury-accumulating *Mucor hiemalis* strain EH8 from cold sulfidic spring water biofilms. **Microbiologyopen**, v. 5, n. 5, p.763-781, 13 maio 2016.
- HAI, F. I.; YAMAMOTO, K.; FUKUSHI, K. Development of a submerged membrane fungi reactor for textile wastewater treatment. **Desalination**, Hongo, v. 192, n. 1-3, p.315-322, 2006.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n.12, p. 1422-1432, 2001.
- ISKANDAR, N. L.; ZAINUDIN, N. A. I. M.; TAN, S. G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. **Journal Of Environmental Sciences**, Malaysia, v. 23, n. 5, p.824-830, 2011.
- ISLAM, M. S. et al. Heavy metal pollution in surface water and sediment: A preliminary assessment of an urban river in a developing country. **Ecological Indicators**, Dumki, v. 48, p.282-291, 2015.
- KADIRVELU, K. et al. Activated carbon prepared from biomass as adsorbent: elimination of Ni (II) from aqueous solution. **Bioresource Technology**, Coimbatore, v. 81, n. 1, p.87-90, 2002.

- KAVAMURA, V. N.; ESPOSITO, E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. **Biotechnology Advances**, Mogi das Cruzes, v. 28, n. 1, p.61-69, 2010.
- KHALID, Sana; SHAHID, Muhammad; NIAZI, Nabeel Khan. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal Of Geochemical Exploration**, v. 182, p.247-268, nov. 2017.
- KHAN, Abdur Rahim et al. Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. **Environmental And Experimental Botany**, v. 135, p.126-135, mar. 2017.
- KINKEL, L. Fungal community dynamics. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Ecology Of Leaves, 1991. p. 253-270.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531 p.
- LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, France, v. 7, n. 3, p.139-153, 1997.
- LEBEAU, T.; BRAUD, A.; JÉZÉQUEL, K. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. **Environmental Pollution**, France, v. 153, n. 3, p.497-522, 2008.
- LI, T.; LIU, M.J.; ZHANG, X.T.; ZHANG, H.B.; SHA, T.; ZHAO, Z.W. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. **Science Of The Total Environment**, Kunming, v. 409, n. 6, p.1069-1074, 2011.
- LI, H.Y.; WEI, D.; SHEN, M.; ZHOU, Z. Endophytes and their role in phytoremediation. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 54, n. 1, p.11-18, 2012.
- LI, Xia et al. Adsorption characteristics of Copper (II), Zinc (II) and Mercury (II) by four kinds of immobilized fungi residues. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 147, p.357-366, jan. 2017.
- LIU, Y. G. et al. Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living *Aspergillus niger*. **Transactions Of Nonferrous Metals Society Of China**, China, v. 16, n. 3, p.681-686, 2006.
- LUO, J. M.; XIAO, X.; LUO, S. L.. Biosorption of cadmium (II) from aqueous solutions by industrial fungus *Rhizopus cohnii*. **Transactions Of Nonferrous Metals Society Of China**, Changsha, v. 20, n. 6, p.1104-1111, 2010.
- KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4. ed. Boca Raton: Crc, 2011. 534 p.
- MARQUEZ, L.M. et al. A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance. **Science**, Ardmore, v. 315, n. 5811, p.513-515, 2007.

- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**. São Paulo: Prodquímica, 1994. 95p.
- MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. **Studies In Mycology**, Manhattan, v. 53, p.173-189, 2005.
- MENESES, T. S. **Fauna, pesca e contaminação por metais pesados em pescado no litoral de Sergipe**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado) - Curso de Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2008.
- MARTINO, E. et al, S. Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of zinc ions. **Mycological Research**, Italy, v. 104, n. 3, p.338-344, 2000.
- MARQUES, A. P. G. C. et al. Zinc accumulation in *Solanum nigrum* is enhanced by different arbuscular mycorrhizal fungi. **Chemosphere**, Porto, v. 65, n. 7, p.1256-1263, 2006.
- MUKHOPADHYAY, M.; NORONHA, S.; SURAIISKUMAR, G. Kinetic modeling for the biosorption of copper by pretreated *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource Technology**, Chennai, v. 98, n. 9, p.1781-1787, 2007.
- MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P.. Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. **Grassland Science**, Vernon, v. 52, n. 1, p.1-14, 2006.
- MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P. Tall fescue aluminum tolerance is affected by *neotyphodium coenophialum* endophyte. **Journal Of Plant Nutrition**, Vernon, v. 22, n. 8, p.1335-1349, 1999.
- MALINOWSKI, D. P.; ZUO, H.; BELESKI, D.P.; ALLOUSH, G.A. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* sp. endophytes. **Plant Soil**, Vernon, v. 267, p.1-12, 2004.
- MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, David P. Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses. **Crop Science**, Vernon, v. 40, n. 4, p.923-940, 2000.
- MISHRA, Harshit; KARMAKAR, Subhankar; KUMAR, Rakesh. A long-term comparative assessment of human health risk to leachate-contaminated groundwater from heavy metal with different liner systems. **Environmental Science And Pollution Research**, p.1-13, 16 nov. 2017.
- MONNET, F.; VAILLANT, N.; HITMI, A.; COUDRED, A.; SALLANON, H. Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*. **Physiol Plant**, France, v. 113, n. 4, p.557-563, 2001.
- MAHBUB, KHANDAKER RAYHAN; KRISHNAN, KANNAN; NAIDU, RAVI. Mercury toxicity to terrestrial biota. **Ecological Indicators**, v. 74, p.451-462, mar. 2017.
- MOHAMMADIAN, E. AHARI, A. B., ARZANLOU, M. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. **Chemosphere**, v. 185, p.290-296, 2017.

NADGÓRSKA-SOCHA, A.; KAFEL, A.; KANDZIORA, M.; GOSPODEREK, J.; ZAWISZA, A. Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. **Environmental Science And Pollution Research**, Bankowa, v. 20, n. 2, p.1124-1134, 2012.

NARENDRULA-KOTHA, Ramya; NKONGOLO, Kabwe K.. Bacterial and fungal community structure and diversity in a mining region under long-term metal exposure revealed by metagenomics sequencing. **Ecological Genetics And Genomics**, v. 2, p.13-24, fev. 2017.

OJUEDERIE, Omena; BABALOLA, Olubukola. Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 14, n. 12, p.1-26, 4 dez. 2017.

OLIVEIRA, R. J. V. **Diversidade e Identificação de Fungos Endofíticos em Folhas de *Cocos nucifera* L., em Goiana Pernambuco, com Base em morfologia e Sequências de rDNA.** 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia de Fungos, Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

OMACINI, M.; CHANETON, E.J.; GHERSA, C.M.; MULLER, C.B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, Buenos Aires, v. 409, n. 6816, p.78-81, 2001.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J.F.M; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p.950-954, 2009.

PEIXOTO NETO, P.A.S; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento**, Brasília, v.29, p. 62-77, 2002.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWA, J.; HIRANO, S. S.. **Microbial ecology of leaves**. New York: Spring Verlag, p. 179-197, 1991.

PIERANGELI, M.A.P.; GUILHERME, L.R.G.; OLIVEIRA, L.R.; CURI, N., SILVA, M.L.N. Efeito da força iônica da solução de equilíbrio sobre a adsorção e dessorção de chumbo em latossolos brasileiros. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, p. 1077-1084, 2001.

PORCEL, E.M. R.; LOPEZ, J.L.; SANCHEZ, J.A.; FERNANDEZ, J.M.; CHISTI, Y. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. **Biochemical Engineering Journal**, Almeria, v. 26, n. 2-3, p.139-144, 2005.

RAHMAN, M. H.; SAIGA, S. Endophytic fungi *Neotyphodium coenophialum* affect the growth and mineral uptake, transport and efficiency ratios in tall fescue *Festuca arundinacea*. **Plant Soil**, Bangladesh, v. 272, n. 1-2, p.163-171, 2005.

RAJAMANIKYAM, M. et al. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 60, p.1-26, 21 ago. 2017.

- RAJKUMAR, M.; SANDHYA, S.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances**, Taramani, v. 30, n. 6, p.1562-1574, 2012.
- RANTA, H.; NEUVONEN, S. The host-pathogen system of *Gremmeniella abietina* Morelet and Scots pine: Effects of nonpathogenic phyllosphere fungi, acid rain and environmental factors. **New Phytol**, Turku, v. 128, p.63-69, 1994.
- REN, A.; GAO, Y.; ZHANG, L.; XIE, F. Effects of cadmium on growth parameters of endophyte-infected endophyte-free ryegrass. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, v. 169, n. 6, p.857-860, 2006.
- RECATALÁ, L. Can be reference values of heavy metals useful as soil quality standards? Contributions from assays in representative Mediterranean agricultural soil. **19th World Congress Of Soil Science, Soil Solutions For A Changing World**, Brisbane, n. 1, p.23-26, 2010.
- RIBEIRO, A. P.; FIGUEIREDO, A.M.G; SANTOS, J.O.; DANTAS, E.; COTRIM, M.E.B.; FIGUEIRA, R.C.L.; FILHO, E.V.S.; WASSEMAN, J.C. Combined SEM/AVS and attenuation of concentration models for the assessment of bioavailability and mobility of metals in sediments of Sepetiba Bay (SE Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, São Paulo, v. 68, n. 1-2, p.55-63, 2013.
- RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J.R.J.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes 3: diversity and functional roles. **New Phytologist**, Seattle, v. 182, n. 2, p.314-330, 2009.
- RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal Of Experimental Botany**, Seattle, v. 59, n. 5, p.1109-1114, 2008.
- SANTAELLA, S. T; GOMES, S.J.; GADELHA, D.A.C.; COSTA, K.O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I.D.B.; LEITAO, R.C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p.139-148, 2009.
- SAIKKONEN, K. Evolution of endophyte?plant symbioses. **Trends In Plant Science**, Jokioinen, v. 9, n. 6, p.275-280, 2004.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, Turku, v. 29, n. 1, p.319-343, 1998.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Germany, v. 109, n. 6, p.661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H.J.; LUDEWING, K.; JONES, P.G.; DORING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, Braunschweig, v. 99, n. 8, p.1007-1015, 1995.

SIEGEL, F. R. **Environmental geochemistry of potentially toxic metals**. Verlag: Springer, 2002. 218 p.

SINGH, Dheeraj K; SHARMA, Vijay K; KUMAR, Jitendra. Diversity of endophytic mycobiota of tropical tree *Tectona grandis* Linn.f.: Spatiotemporal and tissue type effects. **Scientific Reports**, , v. 7, n. 1, p.1-14, 16 jun. 2017.

SHIN, M. N.; SHIM, J.; YOU, Y.; MYUNG, H.; BANG, K.S.; CHO, M.; KAMALAKANNAN, S.; OH, B.T. Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. **Journal Of Hazardous Materials**, Iksan, v. 199-200, p.314-320, 2012.

SHAHABIVAND, Saleh; PARVANEH, Azar; ALILOO, Ali Asghar. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* affected growth, cadmium partitioning and chlorophyll fluorescence of sunflower under cadmium toxicity. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 145, p.496-502, nov. 2017.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. What are endophytes? In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T.n.. **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-verlag, 2006. p. 1-13.

SRIVASTAVA, S.; AHMAD, A.H.; THAKUR, I. S. Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery effluents. **Bioresource Technology**, Uttaranchal, v. 98, n. 5, p.1128-1132, 2007.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Montana, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

TRAN, T. A.; POPOVA, L. P. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. **J. Bot**, Turku, v. 37, n. 1, p.1-13, 2013.

UNNIKUMAR, K. R.; SREE, K. S.; VARMA, A. *Piriformospora indica*: a versatile root endophytic symbiont. **Symbiosis**, India, v. 60, n. 3, p.107-113, 2013.

VARMA, A. **Piriformospora indica**, Sebaciales and their biotechnological applications. London: Springer, Heidelberg, 2013. 397 p.

ZAPOTOCZNY, S.; JURKIEWICZ, A.; TYLKO, G.; ANIESLKA, T.; TURNAU.; K.. Accumulation of copper by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. **Microbiological Research**, Poland, v. 162, n. 3, p.219-228, 2007.

ZHANG, Y.; ZANG, Y; LIU, M.; ZHAO, Z. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: Their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals In Vitro. **The Journal Of Microbiology**, China, v. 46, n. 6, p.624-632, 2008.

- ZHAO, DAKE; LI, TAO; SHEN, MI. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data. **Microbiological Research**, v. 170, p.27-35, jan. 2015.
- ZHENG, You-kun; QIAO, Xin-guo; MIAO, Cui-ping. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals Of Microbiology**, v. 66, n. 2, p.529-542, 25 set. 2015.
- ZAFAR, S.; AQIL, F; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, India, v. 98, n. 13, p.2557-2561, 2007.
- ZAHOOR, Mahwish; IRSHAD, Muhammad; RAHMAN, Hazir. Alleviation of heavy metal toxicity and phytostimulation of *Brassica campestris* L. by endophytic *Mucor* sp. MHR-7. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 142, p.139-149, ago. 2017.
- WONG, J.W.C.; SELVAM, A. Speciation of heavy metals during co-composting of sewage sludge with lime. **Chemosphere**, China, v. 63, n. 6, p.980-986, 2006.
- WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, Arizona, v. 73, p.274-276, 1995.
- WHITE, C.; SAYER, J.A.; GADD, G.M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **Fems Microbiology Reviews**, Dundee, v. 20, n. 3-4, p.503-516, 1997.
- WYSZKOWSKI, M.; WYSZKOWSKA, J. The effect of soil contamination with cadmium on the growth and chemical composition of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) and its relationship with the enzymatic activity of soil. **Environ: Bull**, Fresen, v. 18, n. 7, p.1046-1053, 2009.
- YIN, P.; YU, Q.; JIN, B.; LING, Z. Biosorption removal of cadmium from aqueous solution by using pretreated fungal biomass cultured from starch wastewater. **Water Research**, China, v. 33, n. 8, p.1960-1963, 1999.

CAPÍTULO II

FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS EM ÁREA CONTAMINADA POR METAIS PESADOS E SUA TOLERÂNCIA A MERCÚRIO

Isolation of endophytic fungi in a heavy metals contaminated area and its in vitro tolerance to mercury.

SILVA, L.S.; COLINS, M.S.; SANTANA, N.C.C.; SIQUEIRA, G.M.; SANTOS, J.

(Artigo preparado segundo as normas da revista Fungal Biology)

RESUMO

Um dos principais problemas do mundo contemporâneo é a contaminação do solo e da água por metais pesados. Muitos microrganismos, como os fungos, por exemplo, podem interagir com esses metais pesados do ambiente adquirindo a capacidade de sobreviver por meio de adaptação ou mutações, sendo considerados promissores agentes de biorremediação. Os objetivos deste trabalho foram: (I) avaliar a frequência de fungos endofíticos em plantas de locais sujeitos a contaminação por metais pesados e (II) avaliar a tolerância *in vitro* destes fungos ao mercúrio. Folhas de oito espécies de plantas foram coletadas as margens do Igarapé do Sabino, em região fortemente influenciada pelo Aterro Sanitário da Ribeira, São Luis, Brasil. Essas folhas foram desinfestadas superficialmente e plaqueadas em meio BDA. Os fungos endofíticos recuperados foram purificados, identificados e depositados na coleção micológica do GPDEM/UFMA. A tolerância ao mercúrio das 10 espécies predominantes foi avaliada pelo crescimento micelial destas em placas com meio BDA suplementado com HgCl_2 em sete concentrações (1 a 7 mg.mL^{-1}). No total, 54 isolados foram obtidos. Foram registrados fungos pertencentes a 28 tipos morfológicos distribuídos em 11 gêneros. Análises do índice de tolerância (TI) e do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial indicaram que, apesar de diferenças no comportamento frente ao mercúrio, muitos fungos exibiram níveis de tolerância satisfatórios ao metal. *Scytalidium lignicola* e *Trichoderma* sp. apresentaram alta tolerância e crescimento elevado em meios contendo altas concentrações de HgCl_2 , indicando a possibilidade do uso desses fungos em trabalhos de biorremediação de ambientes contaminados.

Palavras-chave: biorremedição; endófitos; microrganismos; Pestalotiopsis; plantas.

1. INTRODUÇÃO

A principal prática para a eliminação de resíduos sólidos nas grandes cidades é a utilização de aterros sanitários. Baterias usadas, resíduos de tintas, amálgamas de mercúrio e equipamentos elétricos são itens muito encontrados nesses aterros e que podem conter resíduos de metais pesados tóxicos como chumbo, cádmio, arsênico e mercúrio. Esses resíduos contendo compostos metálicos depositados nos aterros sanitários podem se tornar fontes de contaminação em longo prazo para a água, terra, ar e organismos vivos em áreas adjacentes (MUKHERJEE et al., 2004; MISHRA et al., 2017; MAHBUB et al., 2017).

Dentre os organismos que habitam essas áreas contaminadas podemos destacar as plantas e microrganismos. Uma parcela pouco conhecida de microrganismos fúngicos habita o interior das plantas em uma relação simbiótica ou neutra e são denominados fungos endofíticos (AZEVEDO, 2014). Esses fungos podem habitar todas as partes da planta, como folhas, flores, estruturas reprodutivas, pecíolos, galhos, ramos, cascas e raízes. Devido à estreita relação existente entre fungo endofítico e planta hospedeira, várias substâncias podem ser sintetizadas pelos endófitos para promoverem o crescimento e a proteção do vegetal. (FAETH, 2002; RODRIGUEZ et al., 2009).

Entre os benefícios que os fungos garantem às plantas hospedeiras pode-se destacar o incremento da tolerância dessas plantas a metais pesados no ambiente por meio da elevação das taxas de crescimento, como observado em estudos com o fungo *Piriformospora indica* e *Helianthus annuus* na presença de cádmio (SHAHABIVAND et al., 2017). Resultados notáveis foram obtidos com *Gaeumannomyces cylindrosporus*, um fungo endofítico septado negro que incrementou as taxas de fotossíntese e diminuiu a translocação de chumbo em *Zea mays* (BAN; XU; YANG, 2017).

Mesmo na presença de metais pesados, plantas de ambientes contaminados podem exibir alta diversidade de fungos (WASEEM et al. 2017). A alta tolerância desses fungos é documentada para metais como Cd, Zn, Cu, Pb, Fe e Hg, elementos que podem agir como fator seletivo nesses ambientes contaminados (OLADIPO et al., 2017; FROSSARD et al. 2017). Desse modo, alguns fungos possuem a habilidade de sobreviver e acumular esses metais sob condições que são letais para outros organismos (ZAPOTOCZNY et al., 2007). Fungos

endofíticos como *Aspergillus niger* e *Trichoderma asperellum* mostraram-se muito tolerantes, inclusive tolerando concentrações de metais superiores ao encontrado em ambientes contaminados (IRAM et al. 2013; KURNIATI; ARFARITA; IMAI, 2014; FAZLI et al., 2015).

Entre todos os compostos de metais, os compostos de mercúrio têm despertado interesse em relação aos mecanismos de tolerância dos fungos. Em testes com vários metais, como chumbo, cádmio, arsênico e mercúrio, os isolados apresentaram menor tolerância ao mercúrio, o que demonstra a alta toxicidade de compostos desse metal (GURURAJAN, PRASANNA, 2017). No entanto, apesar da alta toxicidade, elevados níveis de mercúrio foram documentados para espécies de fungos em concentrações de até 22 mg/kg, o que evidencia a alta plasticidade que alguns fungos possuem em relação as suas tolerâncias (FALANDYSZ et al., 2015).

As áreas que vem sofrendo com o despejo de metais pesados são consideradas favoráveis para a prospecção de fungos endofíticos resistentes ou tolerantes e constituem uma preciosa fonte de cepas fúngicas resistentes, uma vez que submetem os organismos habitantes a diferentes concentrações de compostos tóxicos ao longo do tempo. Uma destas áreas é o Aterro Municipal da Ribeira, que está localizado no sudoeste da Ilha do Maranhão, a uma distância de aproximadamente 20 km da área urbana da cidade de São Luís, Maranhão, Brasil e apresenta contaminação por Zn, Pb e Hg (CAMPOS et al., 2009). O conhecimento dessa diversidade em ambientes sujeitos a metais pesados, além de gerar uma melhor compreensão entre as relações entre microrganismo e hospedeiro, possibilitará a prospecção de fungos com potencial para remediação de áreas que sofreram com o despejo de metais pesados em longo prazo (QAYYUM et al. 2016; GURURAJAN, PRASANNA, 2017; MOHAMMADIAN et al., 2017).

A maioria dos estudos sobre a toxicidade de compostos de mercúrio foca em organismos aquáticos. Por outro lado, as informações acerca da influência desses compostos na tolerância de organismos terrestres e microrganismos ainda são limitadas (MAHBUB et al., 2017). O estudo da tolerância de *in vitro* de microrganismos, como os fungos endofíticos, é crucial para a descoberta daqueles com habilidades para sobreviver em concentrações altas de compostos metálicos; desse modo, esses microrganismos podem ser aplicáveis para sistemas remediativos em ambientes contaminados. Isso implica que quanto mais rapidamente os fungos podem se adaptar e desenvolver suas colônias em ambientes poluídos, mais benéficos serão para os processos de biorremediação.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a distribuição e a frequência de fungos endofíticos em espécies de plantas fanerógamas de ambientes sujeitos a contaminação por metais pesados, assim como avaliar a tolerância *in vitro* desses fungos a diferentes concentrações de HgCl₂.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

A área de estudo está localizada às margens do Igarapé do Sabino, próximo ao Aterro Municipal da Ribeira, no Município de São Luís, Maranhão, Brasil. O Igarapé do Sabino é um afluente localizado na porção direita da bacia do Rio Tibiri. Essa bacia hidrográfica possui área de 140,04 km² e está localizada na região sudeste da Ilha do Maranhão. (CAMPOS et al., 2009) (Figura 1).

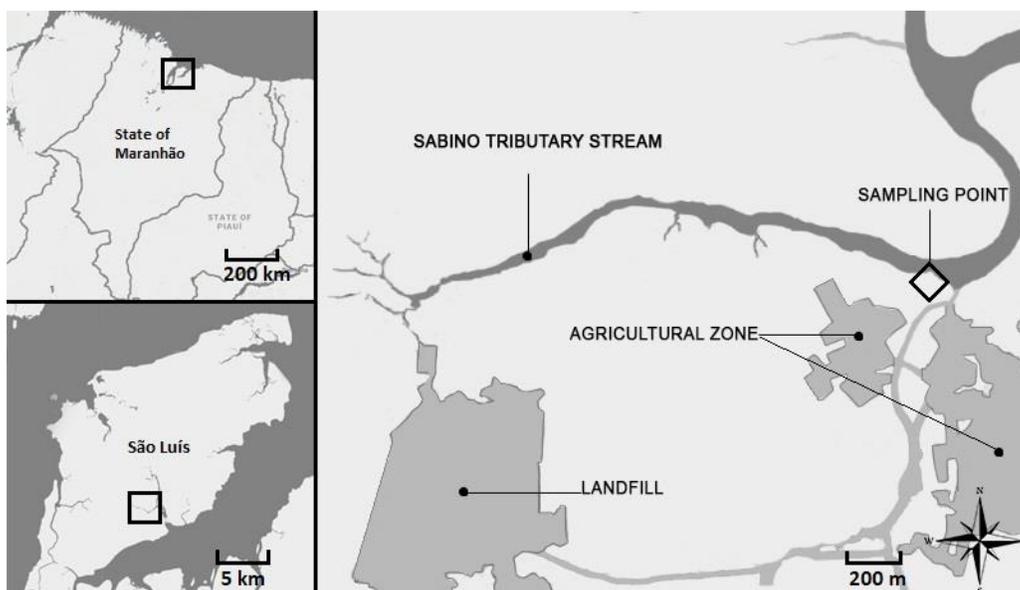


Figura 1. Área de estudo e ponto amostral às margens do Igarapé do Sabino, próximo ao Aterro Municipal da Ribeira, no Município de São Luís, Maranhão, Brasil.

Os tipos de vegetação predominantes nos entornos do Igarapé do Sabino são Manguezal e a Floresta Ombrófila Secundária, com presença de atividade agrícola, principalmente na área

conhecida como Cinturão Verde, onde a agricultura familiar é intensivamente praticada. (EMBRAPA, 2016).

O Aterro Municipal da Ribeira possui 0,62 km² e está localizado no quadrante sudoeste da Ilha do Maranhão, tem causado vários problemas socioambientais pela proximidade de ocupações humanas mais atuais, pois os efluentes contaminados do aterro são lançados na água após passarem pelos poços sumidouros de chorume. Desse modo, uma grande porção dos poluentes oriundos do Aterro da Ribeira pode ficar retida nos solos argilosos do mangue, contaminando a fauna e a flora local.

2.2. Material vegetal

As coletas de material vegetal foram realizadas em um ponto amostral às margens do Igarapé do Sabino, no médio curso, onde foram detectadas as mais altas concentrações de metais pesados na área do Aterro Sanitário da Ribeira, de acordo com os estudos realizados por Campos et al. (2009). Foi definida uma parcela de 10m x 10m e espécies dominantes de plantas fanerógamas lenhosas com troncos de até 20 cm de circunferência a 10 cm do solo foram selecionadas para as coletas, pois espécies de plantas abundantes podem ter mais chances de apresentarem fungos endofíticos resistentes (LI et al., 2012). No mínimo, três amostras de cada planta foram coletadas. Dos espécimes coletados, foram feitas fotografias e registradas informações sobre procedência, altura, diâmetro do tronco, aroma das folhas, hábitos e hábitat, assim como coordenadas geográficas.

O material coletado foi devidamente acondicionado em sacos de polipropileno e caixas de isopor, e foram imediatamente levados ao Laboratório de Ecologia Vegetal da Universidade Federal do Maranhão e armazenados a 4°C até o momento do processamento. Os espécimes de plantas coletados durante as excursões de campo foram prensados, secos em estufa, herborizados e encaminhados ao Laboratório de Estudos Botânicos (LEB-UFMA) para identificação e incorporação ao acervo do Herbário do Maranhão (Herbário-MAR).

2.3. Distribuição e frequência de fungos endofíticos

O procedimento de isolamento e purificação aconteceu de acordo com a metodologia descrita por Arnold et al. (2000) e Silva et al. (2006). Para evitar o isolamento de

microrganismos epifíticos, primeiramente, o material vegetal foi lavado abundantemente com água corrente e detergente neutro, e, em seguida, submetido a desinfestação superficial do material em álcool etílico 70% (1 min), NaClO 3% (4 min), e novamente em álcool etílico 70% (30 s)

Após a assepsia, fragmentos de folhas de 5 mm² de cada amostra foram plaqueados em meio de batata, dextrose e ágar (BDA), acrescido de 50 mg.L⁻¹ de cloranfenicol. Foram plaqueados 5 fragmentos por placa, totalizando 100 fragmentos de folhas por planta coletada. As placas com os fragmentos foram incubadas a 25 ± 2 °C, com 12 horas de escuro e 12 horas de iluminação.

Após sete dias, foram determinadas as taxas de colonização (TC) de acordo com (PETRINI *et al.* 1992), onde TC = número total de fragmentos com um ou mais isolados dividido pelo total de fragmentos da amostra e expressa em percentagem. As colônias fúngicas que se apresentavam distintas umas das outras, foram isoladas e purificadas em meio BDA. Para identificação, foram feitas microculturas utilizando-se bloco de Agar sobre lâmina de vidro estéril. O fungo foi inoculado, nos 4 lados do bloco de ágar a partir de repique recente e coberto com uma lamínula esterilizada. Após o desenvolvimento de hifas e estruturas reprodutivas os fungos foram identificados segundo as suas características macro e micro morfológicas, através de chaves de identificação disponíveis na literatura (BARNETT, HUNTER, 1976; DE HOOG *et al.*, 2000; DUGAN, 2006).

A frequência absoluta e a frequência relativa dos fungos endofíticos isolados das diferentes plantas foram calculadas e comparadas. Todos os isolados foram submetidos à preservação em água destilada estéril pelo método de preservação Castellani (CASTELLANI, 1967) e depositados na coleção micológica do Grupo de Pesquisa em Diversidade e Ecologia Microbiana da Universidade Federal do Maranhão.

2.4. Tolerância *in vitro* de fungos endofíticos ao mercúrio

Os fungos endofíticos foram submetidos a testes de tolerância ao mercúrio (Hg), avaliada pelo efeito de diferentes concentrações deste contaminante no crescimento do micélio fúngico (KURNIATI; ARFARITA; IMAI, 2014).

A partir da solução padrão-estoque de HgCl_2 1.000 mg.L^{-1} , foram preparadas as soluções utilizadas nos experimentos. Alíquotas da solução de HgCl_2 (1.000 mg.L^{-1}) foram adicionadas a erlenmeyers contendo meio BDA de modo a obter concentrações finais de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mg.L^{-1} de HgCl_2 . Dez isolados foram selecionados para os testes de tolerância, de acordo com as características de crescimento e vigor: *Aspergillus flavus* (LS52), *Aspergillus fumigatus* (LS10), *Aspergillus japonicus* (LS53), *Aspergillus niger* (LS51), *Aspergillus tamarii* (LS42), *Chaetomium globosum* (LS38), *Chaetomium* sp. (LS39), *Pestalotiopsis microspora* (LS49) *Scytalidium lignicola* (LS50), *Trichoderma* sp. (LS46).

Fragmentos de micélio de 5 mm de diâmetro dos isolados provenientes de subculturas recentes foram colocados no centro de placas com BDA nas oito concentrações de HgCl_2 . As placas foram incubadas a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 dias e o crescimento radial do micélio de cada fungo foi mensurado diariamente.

2.5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 8 tratamentos e três repetições para cada isolado fúngico. O índice de tolerância (TI) de cada isolado foi obtido pela divisão do crescimento radial da colônia na presença do metal pelo crescimento radial da colônia no tratamento controle. O TI de cada isolado foi assim classificado: 0,00-0,39 (muito baixa tolerância); 0,40-0,59 (baixa tolerância); 0,60-0,79 (tolerância moderada); 0,80-0,99 (alta tolerância) e $\text{TI} \geq 1$ (tolerância muito alta) (OLADIPO et al. 2017). O Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{IVCM} = \Sigma (D - D_a) / N$$

Sendo: IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial; D= diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N= número de dias após a inoculação.

Análises de variância (ANOVA) e de regressão foram realizadas e as médias de IVCM foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados no software Statistica versão 10 (StatSoft®).

3. RESULTADOS

3.1. Distribuição e frequência de fungos endofíticos

Oito plantas foram amostradas às margens do Igarapé do Sabino, São Luís, Maranhão, Brasil. Duas dessas plantas foram identificadas em nível de família, cinco plantas foram identificadas em nível de espécie, e uma não apresentou, nos períodos de visitas a área, estruturas que possibilitassem a identificação. Somente os fragmentos de folhas da espécie não identificada apresentaram baixa frequência de colonização (15%). Os fragmentos de folhas todas as outras plantas coletadas apresentaram taxa de colonização de 100% (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação das plantas amostradas às margens do Igarapé do Sabino, São Luís, Maranhão, Brasil. Legendas: TC = taxa de colonização fúngica, “*” = espécie não identificada, “**” = planta identificada apenas em nível de família.

Identificação	Família	T.C.
<i>Abarema jupunba</i> (Willd.) Britton & Killip	Fabaceae	100%
<i>Agonandra brasiliensis</i> Miers ex Benth. & Hook.f.	Opiliaceae	100%
<i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.	Arecaceae	100%
<i>Eriotheca globosa</i> (Aubl.) A.Robyns	Malvaceae	100%
<i>Lecythis lurida</i> (Miers) S.A.Mori	Lecythidaceae	100%
Não identificada *	-	15%
Chrysobalanaceae **	Chrysobalanaceae	100%
Myrtaceae **	Myrtaceae	100%

Das oito plantas amostradas, 54 isolados fúngicos foram obtidos. Foram registrados fungos pertencentes a 28 tipos morfológicos distribuídos em 11 gêneros e 5 morfotipos cuja identificação não pode ser confirmada através dos métodos empregados (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos isolados de fungos endofíticos provenientes de plantas coletadas às margens do Igarapé do Sabino, depositados no banco de fungos do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA/UFMA).

Isolado	Identificação	Hospedeiro	n° de depósito
LS01	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Lecythis lurida</i>	721
LS02	Morfotipo 1	<i>Lecythis lurida</i>	1120
LS03	<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Lecythis lurida</i>	731
LS04	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Lecythis lurida</i>	703
LS05	<i>Pestalotiopsis</i> sp1	<i>Lecythis lurida</i>	727
LS06	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Lecythis lurida</i>	718
LS07	<i>Macrophomina</i> sp1	<i>Lecythis lurida</i>	713
LS08	<i>Chaetomium globosum</i>	Não identificado	704
LS09	<i>Aspergillus niger</i>	Não identificado	435
LS10	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Não identificado	434
LS11	<i>Colletotrichum</i> sp1	Não identificado	710
LS12	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Chrysobalanaceae	722
LS13	Morfotipo 1	Chrysobalanaceae	1121
LS14	<i>Chaetomium globosum</i>	Chrysobalanaceae	705
LS15	<i>Pestalotiopsis</i> sp1	Chrysobalanaceae	728
LS16	<i>Aspergillus</i> sp.	Chrysobalanaceae	437
LS17	<i>Nigrospora</i> sp.	Chrysobalanaceae	719
LS18	<i>Macrophomina</i> sp1	Chrysobalanaceae	714
LS19	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Myrtaceae	723
LS20	Morfotipo 1	Myrtaceae	1122
LS21	<i>Scytalidium</i> sp.	Myrtaceae	732
LS22	<i>Chaetomium globosum</i>	Myrtaceae	706
LS23	<i>Colletotrichum</i> sp1	Myrtaceae	711
LS24	<i>Aspergillus</i> sp.	Myrtaceae	438
LS25	<i>Pestalotiopsis</i> sp2	Myrtaceae	729
LS26	<i>Recurvomyces</i> sp.	Myrtaceae	730
LS27	<i>Nigrospora</i> sp.	Myrtaceae	720
LS28	<i>Colletotrichum</i> sp2	Myrtaceae	712
LS29	<i>Septoria</i> sp.	Myrtaceae	735
LS30	<i>Macrophomina</i> sp1	Myrtaceae	715
LS31	<i>Macrophomina</i> sp2	Myrtaceae	716
LS32	<i>Botrytis</i> sp.	Myrtaceae	702
LS33	<i>Macrophomina</i> sp3	<i>Agonandra brasiliensis</i>	717

LS34	Morfotipo 2	<i>Agonandra brasiliensis</i>	1123
LS35	Morfotipo 3	<i>Agonandra brasiliensis</i>	1126
LS36	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Agonandra brasiliensis</i>	707
LS37	<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Agonandra brasiliensis</i>	431
LS38	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Abarema jupunba</i>	708
LS39	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Abarema jupunba</i>	709
LS40	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Abarema jupunba</i>	724
LS41	Morfotipo 4	<i>Abarema jupunba</i>	1127
LS42	<i>Aspergillus tamaritii</i>	<i>Abarema jupunba</i>	433
LS43	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Abarema jupunba</i>	736
LS44	<i>Scytalidium lignicola</i>	<i>Abarema jupunba</i>	733
LS45	Morfotipo 5	<i>Eriotheca globosa</i>	1128
LS46	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Eriotheca globosa</i>	737
LS47	Morfotipo 2	<i>Eriotheca globosa</i>	1124
LS48	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Eriotheca globosa</i>	726
LS49	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Astrocaryum vulgare</i>	725
LS50	<i>Scytalidium lignicola</i>	<i>Astrocaryum vulgare</i>	734
LS51	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Astrocaryum vulgare</i>	436
LS52	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Astrocaryum vulgare</i>	430
LS53	<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Astrocaryum vulgare</i>	432
LS54	Morfotipo 2	<i>Astrocaryum vulgare</i>	1125

O maior número de isolados fúngicos, assim como maior número de espécies de fungos foi registrado na planta identificada como Myrtaceae, sendo 14 isolados e 13 espécies de fungos pertencentes a 10 gêneros distintos e um morfotipo não identificado. Em contrapartida, o menor número de isolados fúngicos, assim como menor número de espécies de fungos ocorreu na planta não identificada e na planta *Eriotheca globosa*. Foram isolados quatro espécies de três gêneros de fungos endofíticos na planta não identificada e quatro isolados de 2 gêneros distintos da *E. globosa*, sendo ainda registrados 2 morfotipos de fungos não identificados (Figura 2).

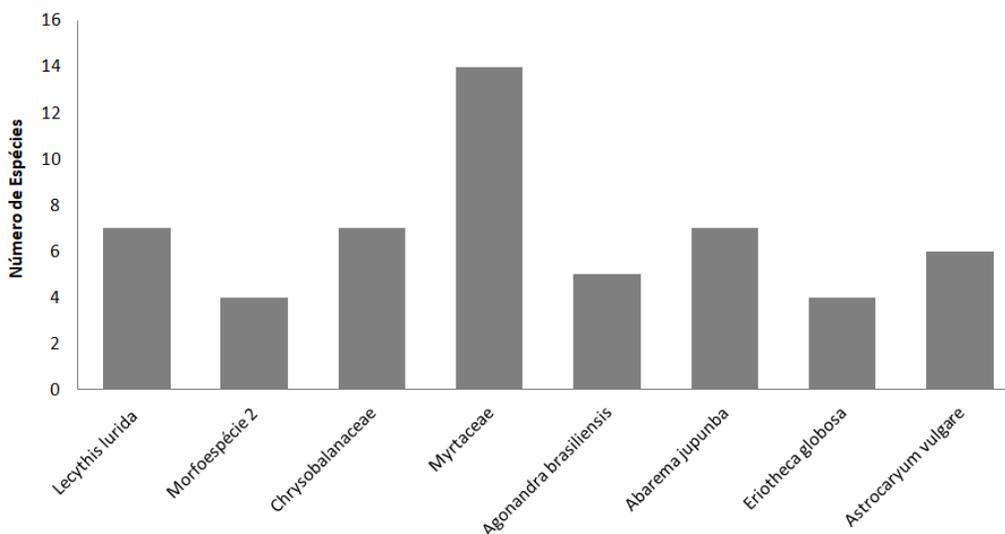


Figura 2. Número de espécies de fungos endofíticos por espécie de plantas amostradas às margens do Igarapé do Sabino, São Luís, Maranhão, Brasil.

O fungo endofítico com maior prevalência foi *Pestalotiopsis microspora* (47.25%), enquanto a menor prevalência foi registrada para *Aspergillus flavus*, *Chaetomium* sp. e *Macrophomina* sp3, sendo que todos apresentaram a mesma frequência (0.37%).

No presente estudo, *Chaetomium globosum* e *Pestalotiopsis microspora* foram isolados de 6 das 8 plantas coletadas. *C. globosum* foi isolado de *L. lurida*, da planta não identificada, de Chrysobalanaceae, de Myrtaceae, *A. brasiliensis* e *A. jupunba*. *P. microspora* foi isolado de *L. lurida*, Chrysobalanaceae, Myrtaceae, *A. jupunba*, *E. globosa* e *A. vulgare*. Esses fungos apresentaram frequências altas em relação aos outros táxons de fungos e não apresentaram especificidade para nenhuma das plantas hospedeiras. Por outro lado, o fungo *Aspergillus fumigatus* foi exclusivo da planta não identificada; *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp2, *Macrophomina* sp2, *Pestalotiopsis* sp2, *Recurvomyces* sp. e *Septoria* sp. foram exclusivos de Myrtaceae; *Macrophomina* sp3 e Morfotipo 3 foram exclusivos de *A. brasiliensis*; *Aspergillus tamarii*, *Chaetomium* sp. e Morfotipo 4 foram exclusivos de *A. jupunba*; Morfotipo 5 foi exclusivo de *E. globosa* e *A. flavus* foi exclusivo de *A. vulgare* (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação e frequência de fungos endofíticos isolados de plantas das margens do Igarapé do Sabino, São Luís, MA, Brasil. Legendas: P1= *L. lurida*, P2= Não identificada 2, P3= Chrysobalanaceae, P4= Myrtaceae, P5=*A. brasiliensis*, P6= *A. jupunba*, P7= *E. globosa*, P8= *A. vulgare*, F.A.= frequência absoluta e F.R.= frequência relativa.

Fungo Endofítico	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	F.A.	F.R.(%)
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0.37
<i>Aspergillus japonicus</i>	0	0	0	0	8	0	0	2	10	1.25
<i>Aspergillus tamarii</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	4	0	0	0	0	0	0	4	0.5
<i>Aspergillus niger</i>	0	5	0	0	0	0	0	1	6	0.75
<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	8	9	0	0	0	0	17	2.12
<i>Botrytis</i> sp.	0	0	0	11	0	0	0	0	11	1.37
<i>Chaetomium globosum</i>	10	5	10	13	5	42	0	0	85	10.62
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0.37
<i>Colletotrichum</i> sp1	0	2	0	10	0	0	0	0	12	1.5
<i>Colletotrichum</i> sp2	0	0	0	17	0	0	0	0	17	2.12
<i>Macrophomina</i> sp1	40	0	14	22	0	0	0	0	76	9.5
<i>Macrophomina</i> sp2	0	0	0	7	0	0	0	0	7	0.8
<i>Macrophomina</i> sp3	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0.37
Morfotipo 1	52	0	11	27	0	0	0	0	90	11.25
Morfotipo 2	0	0	0	0	2	0	14	8	24	3
Morfotipo 3	0	0	0	0	90	0	0	0	90	11.25
Morfotipo 4	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0.5
Morfotipo 5	0	0	0	0	0	0	10	0	10	1.25
<i>Nigrospora</i> sp.	22	0	35	27	0	0	0	0	84	10.5
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	80	0	60	55	0	51	32	100	378	47.25
<i>Pestalotiopsis</i> sp1	48	0	40	0	0	0	0	0	88	11
<i>Pestalotiopsis</i> sp2	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0.75
<i>Recurvomyces</i> sp.	0	0	0	19	0	0	0	0	19	2.37
<i>Scytalidium</i> sp.	37	0	0	11	0	0	0	0	48	6
<i>Scytalidium lignicola</i>	0	0	0	0	0	5	0	25	30	3.75
<i>Septoria</i> sp.	0	0	0	15	0	0	0	0	15	1.87
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	0	0	0	3	23	0	26	3.25

Os fungos exclusivos apresentaram baixa frequência relativa, exceto o Morfotipo 3 que foi isolado unicamente da espécie de planta *Agonandra brasiliensis* e apresentou frequência relativa de 11.25% (Figura 3).

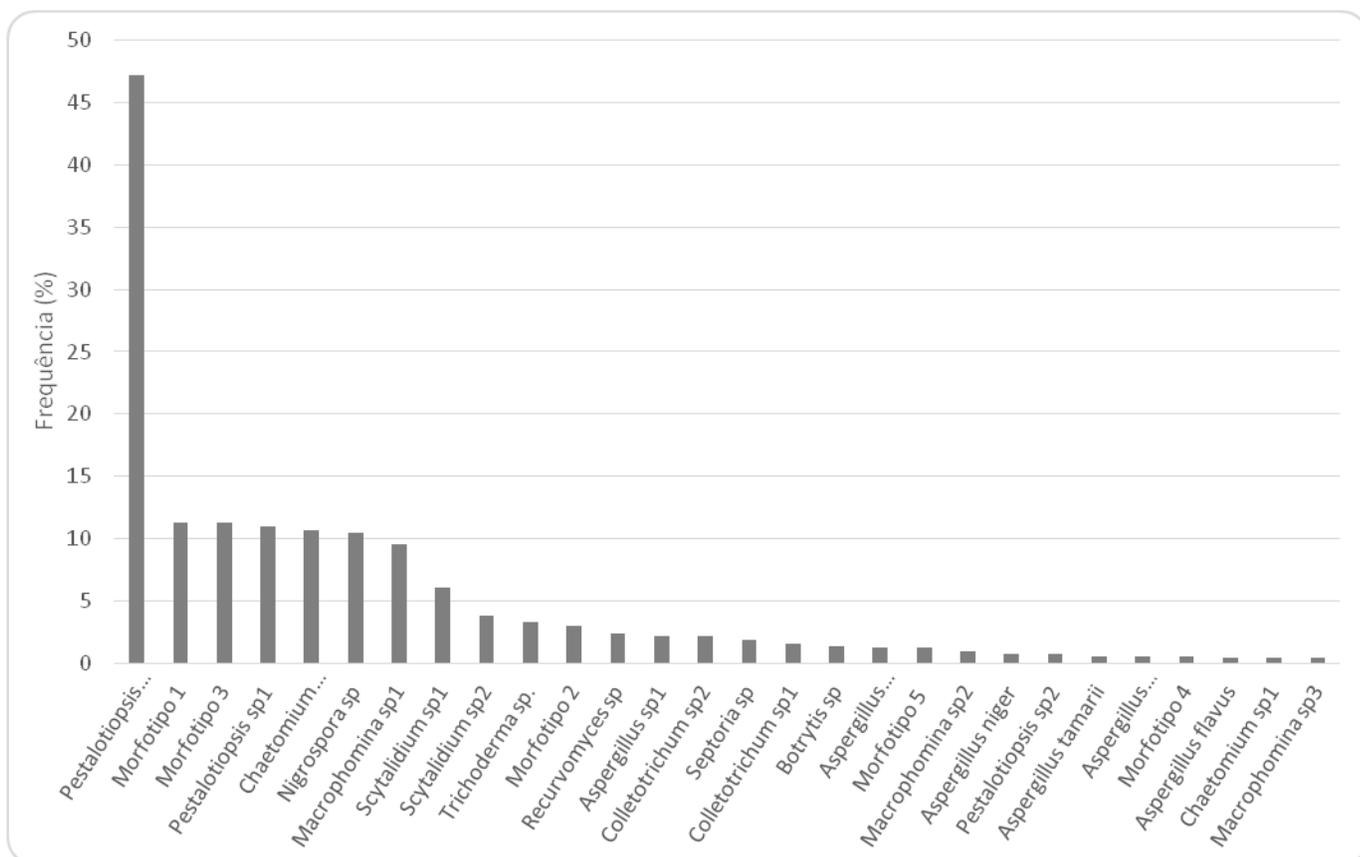


Figura 3. Frequência relativa de fungos endofíticos isolados em plantas das margens do Igarapé do Sabino, São Luís, MA, Brasil.

3.2. Tolerância *in vitro* de fungos endofíticos ao mercúrio

3.2.1. Crescimento micelial

O crescimento micelial dos isolados foi notavelmente influenciado pela adição das diferentes doses de HgCl_2 ao meio. Todos os fungos apresentaram crescimento micelial até a concentração de 4 mg.L^{-1} de HgCl_2 ; no entanto, a partir da concentração de 5 mg.L^{-1} , *A. niger* LS51, *A. flavus* LS52 e *A. tamarii* LS42 tiveram crescimento totalmente inibido. *A. fumigatus* LS10 e *A. japonicus* LS53 apresentaram crescimento até a concentração de 5 mg.L^{-1} de HgCl_2 . Por outro lado, *Chaetomium globosum* LS38, *Chaetomium* sp. LS39, *Scytalidium lignicola* LS50, *Pestalotiopsis microspora* LS49 e *Trichoderma* sp. LS46 apresentaram crescimento micelial até a última concentração de HgCl_2 testada.

O crescimento micelial radial foi influenciado pela adição das doses de HgCl_2 para todos os isolados, exceto para *Scytalidium lignicola* LS50, que atingiu o diâmetro máximo (85 mm) em todos os tratamentos. *Chaetomium globosum* LS38, *Chaetomium* sp. LS39, *Aspergillus niger* LS51, *Pestalotiopsis microspora* LS49, *Aspergillus flavus* LS52 e *A. fumigatus* LS10 apresentaram comportamento quadrático decrescente em relação as doses de HgCl_2 . *Trichoderma* sp. LS46 colonizou 100% da área das placas nos tratamentos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mg.L^{-1} de HgCl_2 ; no entanto, na concentração de 7 mg.L^{-1} de HgCl_2 , o isolado exibiu crescimento de 81.17 mm.

Verifica-se que o crescimento micelial de *Aspergillus niger* LS51 diminuiu em até 82,35% com relação ao controle quando adicionado 3 mg.L^{-1} de HgCl_2 . Com base nessa redução do crescimento, essa dose provocou a maior declividade da curva de crescimento micelial. *Chaetomium* sp. LS39 e *Pestalotiopsis microspora* LS49 apresentaram acentuado crescimento radial na concentração de 1 mg.L^{-1} de HgCl_2 e posterior redução nas concentrações seguintes. Além disso, *P. microspora* exibiu outro acentuado crescimento na concentração de 5 mg.L^{-1} de HgCl_2 , o que foi exclusivo para esse isolado. Somente *Chaetomium* sp. LS39 atingiu crescimento superior ao tratamento controle, 65 mm na concentração de 1 mg.L^{-1} de HgCl_2 e 44 mm no controle (Figura 4).

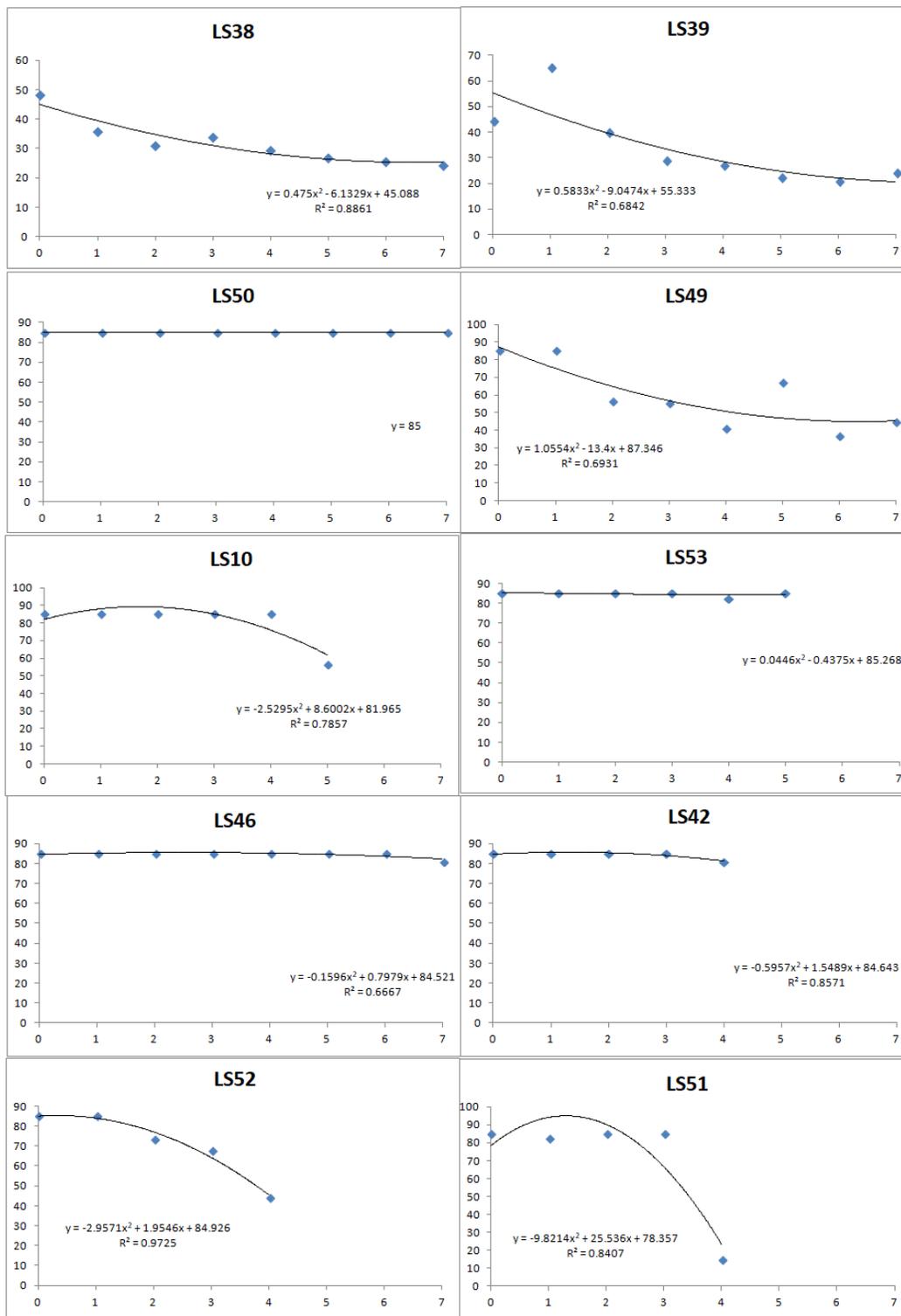


Figura 4. Gráficos de regressão do crescimento (eixo y, em mm) em função da concentração de mercúrio (eixo x, em mg.L⁻¹) no meio de cultura para cada isolado estudado. *Aspergillus flavus* (LS52), *Aspergillus fumigatus* (LS10), *Aspergillus japonicus* (LS53), *Aspergillus niger* (LS51), *Aspergillus tamaraii* (LS42), *Chaetomium globosum* (LS38), *Chaetomium* sp. (LS39), *Pestalotiopsis microspora* (LS49) *Scytalidium lignicola* (LS50), *Trichoderma* sp. (LS46).

3.2.2. Índice de Tolerância

A máxima concentração na qual houve crescimento micelial em todos os isolados foi utilizada para a obtenção dos índices de tolerância. De acordo com os índices de tolerância (TI), todos os fungos endofíticos avaliados foram sensíveis ao HgCl_2 ($\text{TI} < 1$), ou seja, nenhum dos isolados apresentou índice de tolerância igual ou superior a 1, índice no qual o crescimento do tratamento com metal não difere do tratamento controle; contudo, 20% dos isolados testados apresentou índice de tolerância de 0.9 (Figura 3).

Dois isolados apresentaram tolerância muito baixa ($\text{TI} \leq 0.39$), *Pestalotiopsis microspora* LS49 ($\text{TI}=0.36$) e *Aspergillus niger* LS51 ($\text{TI}=0.07$). Dois isolados apresentaram baixa tolerância ($0.40 \leq \text{TI} \leq 0.59$), *A. flavus* LS52 ($\text{TI}=0.47$) e *Chaetomium globosum* LS38 ($\text{TI}=0.57$). Três isolados apresentaram tolerância moderada ($0.60 \leq \text{TI} \leq 0.79$), *Chaetomium* sp. LS39 ($\text{TI}=0.65$) *A. tamaritii* LS42 ($\text{TI}=0.71$) e *A. fumigatus* LS10 ($\text{TI}=0.76$). Três dos isolados apresentaram alta tolerância ($0.80 \leq \text{TI} \leq 0.99$), *A. japonicus* LS53 ($\text{TI}=0.84$), *Scytalidium lignicola* LS50 ($\text{TI}=0.90$) e *Trichoderma* sp. LS46 ($\text{TI}=0.95$) (Figura 5).

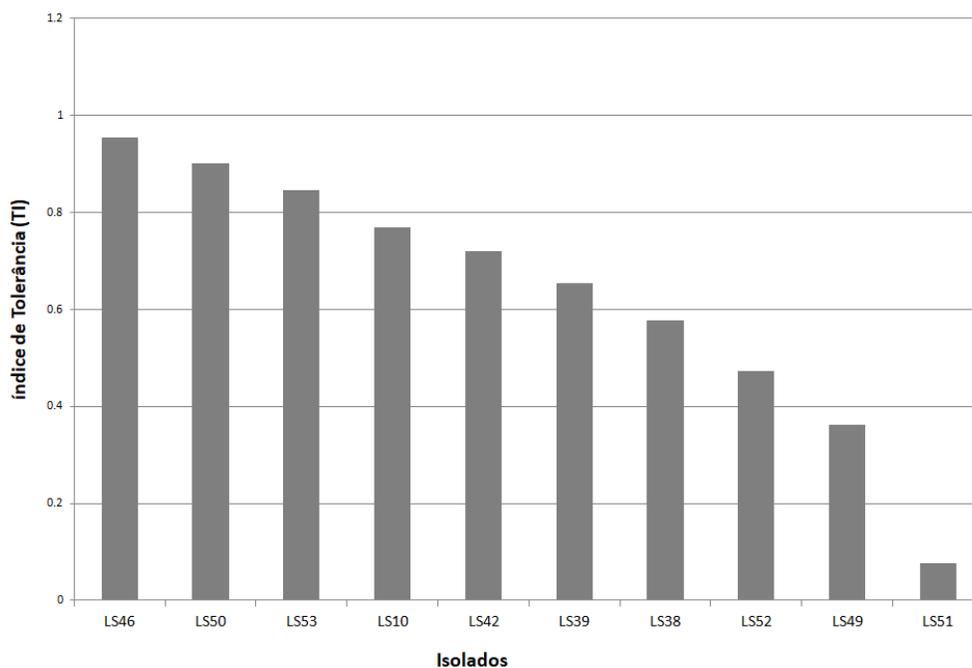


Figura 5. Média dos índices de tolerância dos isolados cultivados por 10 dias em meio de cultura com 4 mg.L^{-1} de HgCl_2 . *Aspergillus flavus* (LS52), *Aspergillus fumigatus* (LS10), *Aspergillus japonicus* (LS53), *Aspergillus niger* (LS51), *Aspergillus tamaritii* (LS42), *Chaetomium globosum* (LS38), *Chaetomium* sp. (LS39), *Pestalotiopsis microspora* (LS49) *Scytalidium lignicola* (LS50), *Trichoderma* sp. (LS46).

Observou-se um o padrão de desenvolvimento da tolerância dos fungos em estágios ou fases. Os isolados *Aspergillus fumigatus* LS10 e *A. tamaritii* LS42 exibiram a fase de atraso ou de nenhum crescimento nos primeiros dias, a fase de crescimento acelerado, a queda no crescimento e um posterior aumento do crescimento micelial. *Chaetomium* sp. LS39, *Trichoderma* sp. LS46, *Chaetomium globosum* LS38, *Scytalidium lignicola* LS50 e *Pestalotiopsis microspora* LS49 mostraram desempenho similar em relação aos padrões de desenvolvimento de tolerância; contudo, sem a fase de atraso inicial (Figura 6).

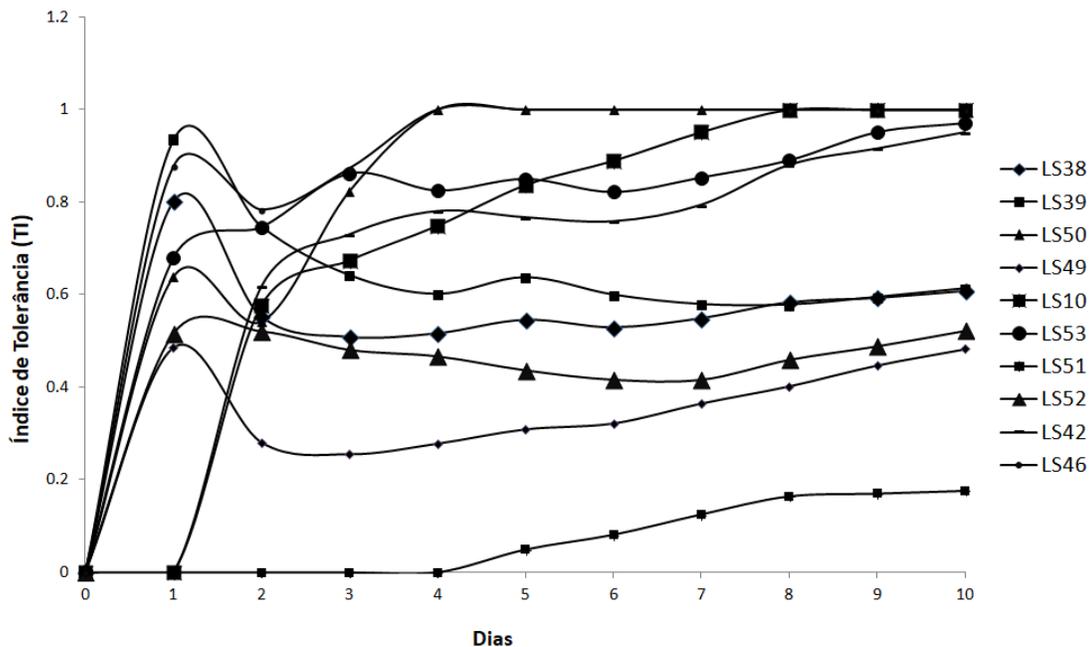


Figura 6. Índices de tolerância dos isolados fúngicos cultivados por 10 dias em 4 mg.L⁻¹ de HgCl₂. *Aspergillus flavus* (LS52), *Aspergillus fumigatus* (LS10), *Aspergillus japonicus* (LS53), *Aspergillus niger* (LS51), *Aspergillus tamaritii* (LS42), *Chaetomium globosum* (LS38), *Chaetomium* sp. (LS39), *Pestalotiopsis microspora* (LS49) *Scytalidium lignicola* (LS50), *Trichoderma* sp. (LS46).

O desenvolvimento da tolerância em fases foi menos evidente para os isolados *Aspergillus niger* LS51, *A. flavus* LS52 e *A. japonicus* LS53. *A. niger* LS51 exibiu os menores

índices de tolerância e seus índices permaneceram muito abaixo de 1, mesmo no décimo dia. *A. flavus* LS52 foi o isolado que menos apresentou variações de tolerância ao metal ao longo de 10 dias.

O índice de tolerância variou com o tempo de exposição ao metal pesado e tipo de fungo. Na fase inicial após a inoculação ou fase de atraso, o índice de tolerância permaneceu 0 por um ou mais dias para 3 isolados. Essa é a fase na qual alguns fungos apresentam pouco ou nenhum crescimento. *Aspergillus tamaris* LS42 e *A. fumigatus* LS10 apresentaram índices de tolerância 0 no primeiro dia; no entanto, esses índices aumentaram com o tempo. Apesar dos índices serem 0 no primeiro dia, estes fungos alcançaram alta tolerância rapidamente. *A. niger* LS51 apresentou índice de tolerância 0 por 4 dias; contudo, esse índice foi crescente ao longo dos dias, mesmo que de forma mais lenta.

Pestalotiopsis microspora LS49 apresentou índice de tolerância de 0.48 no primeiro dia e apresentou uma queda para 0.28 no segundo dia; no entanto, o aumento desse índice foi gradativo ao longo dos dias, voltando a 0.48 aos 10 dias. *Scytalidium lignicola* LS50 e *Trichoderma* sp. LS46 exibiram desempenhos similares em relação ao ganho de tolerância com o tempo. Esses dois isolados alcançaram alta tolerância em menos dias, mesmo exibindo queda nos índices no segundo dia do experimento. *Chaetomium globosum* LS38 e *Chaetomium* sp. LS39 exibiram resultados similares em relação à queda dos índices de tolerância no segundo dia do experimento, com posterior aumento desses índices, entretanto a tolerância desses isolados foi adquirida de forma mais lenta ao longo do tempo.

3.2.3. Índice de velocidade de crescimento

Isolados pertencentes ao mesmo gênero tendem a apresentar índices de velocidade de crescimento similares quando submetidos às mesmas concentrações de HgCl₂. Além disso, há influências notáveis no índice de velocidade de crescimento micelial de alguns isolados em relação às crescentes concentrações de metal (Tabela 4).

Aspergillus flavus, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Chaetomium* sp. e *Pestalotiopsis microspora* apresentaram diminuição na velocidade de crescimento frente às crescentes concentrações de metal. *A. fumigatus*, *A. japonicus* e *A. tamaris* apresentaram

variações bruscas em relação aos índices de crescimento micelial. Esses isolados não se desenvolveram nas subseqüentes concentrações logo após apresentarem os mais altos índices de crescimento micelial dentre todos os isolados. Por outro lado, *Scytalidium lignicola* e *Trichoderma* sp. tendem a aumentar a velocidade de crescimento frente às crescentes concentrações de metal, sendo que *S. lignicola* obteve maior incremento na velocidade de crescimento, com IVCm de 4.48 no tratamento de 1 mg e IVCm de 7.25 no tratamento de 7 mg.L⁻¹ de HgCl₂.

No tratamento de 1 mg.L⁻¹ de HgCl₂, foram observadas diferenças significativas notáveis entre os índices de velocidade de crescimento micelial de *Aspergillus fumigatus* e *Chaetomium globosum*, que apresentaram IVCm de 7.58 e 2.40, respectivamente. No tratamento de 2 mg.L⁻¹ de HgCl₂, *Aspergillus fumigatus* exibiu IVCm de 7.68, índice significativamente diferente de 2.28, IVCm exibido por *Chaetomium globosum* na mesma concentração de HgCl₂.

No tratamento de 3 mg.L⁻¹ de HgCl₂, o isolado que apresentou maior índice de velocidade de crescimento foi *Aspergillus fumigatus*, com IVCm de 7.90, significativamente diferente do índice de 2.15 que foi apresentado por *Chaetomium* sp., menor índice para essa concentração de HgCl₂. *Aspergillus fumigatus* exibiu IVCm de 8.50 no tratamento de 4 mg.L⁻¹ de HgCl₂, o maior índice de velocidade de crescimento dentre todos os isolados e concentrações de HgCl₂. O menor índice na concentração de 4 mg.L⁻¹ de HgCl₂ foi exibido por *Aspergillus niger*, com IVCm de 1.50.

Desconsiderando-se os isolados que não resistiram a concentração de 5 mg.L⁻¹ de HgCl₂, o isolado que apresentou maior índice de velocidade de crescimento nesse tratamento foi *Aspergillus japonicus*, com IVCm de 8.03, índice significativamente diferente do exibido por *Chaetomium* sp., com IVCm de 1.35.

A. flavus, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger* e *A. tamarii* não apresentaram crescimento no tratamento de 6 mg.L⁻¹ de HgCl₂; desse modo, os índices de velocidade de crescimento desses isolados permaneceram iguais a zero até o final dos experimentos. O maior índice de velocidade de crescimento nesse tratamento foi apresentado por *Scytalidium lignicola*, com IVCm de 6.98. *Chaetomium* sp. apresentou IVCm de 1.23, o menor índice dentre os isolados que exibiram crescimento micelial nesse tratamento. No tratamento de 7 mg.L⁻¹ de HgCl₂, *Scytalidium lignicola* apresentou o maior índice de velocidade de crescimento, sendo que *Chaetomium* sp.

exibiu IVCM de 1.57, o menor índice dentre os isolados que exibiram crescimento micelial nesse tratamento.

Tabela 4. Índices de velocidade de crescimento micelial dos isolados. Medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Espécie	Controle	1 mg.L ⁻¹	2 mg.L ⁻¹	3 mg.L ⁻¹	4 mg.L ⁻¹	5 mg.L ⁻¹	6 mg.L ⁻¹	7 mg.L ⁻¹
		HgCl ₂						
<i>Aspergillus flavus</i>	7,30 ab	6,93 ab	6,57 b	5,78 ab	3,90 b	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7,70 a	7,58 a	7,68 a	7,90 a	8,50 a	5,67 a	-	-
<i>Aspergillus japonicus</i>	7,20 b	6,55 ab	6,90 ab	6,97 a	7,37 a	8,03 a	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	7,50 ab	6,75 ab	7,93 a	7,47 a	1,50 b	-	-	-
<i>Aspergillus tamarii</i>	7,40 ab	6,87 ab	7,25 ab	7,42 a	8,08 a	-	-	-
<i>Chaetomium globosum</i>	3,50 d	2,40 c	2,28 d	2,53 c	2,13 b	1,88 b	1,75 c	1,62 d
<i>Chaetomium</i> sp.	3,45 d	5,52 b	3,10 d	2,15 c	1,75 b	1,35 b	1,23 c	1,57 d
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	6,90 b	7,42 a	4,57 c	4,83 b	3,23 b	5,82 a	2,85 a	3,55 c
<i>Scytalidium lignicola</i>	5,90 c	4,48 b	6,53 b	5,47 b	6,73 ab	6,70 a	6,98 a	7,25 a
<i>Trichoderma</i> sp.	5,40 c	5,80 b	6,50 b	6,15 ab	5,88 ab	6,43 a	6,42 a	6,03 c

Chaetomium globosum e *Chaetomium* sp. apresentaram velocidades de crescimento similares. Esses dois isolados exibiram velocidades de crescimento significativamente diferentes somente na concentração de 1 mg.L⁻¹ de HgCl₂, sendo que *Chaetomium* sp. apresentou velocidade de crescimento de 5.52, superior a velocidade de crescimento de *Chaetomium globosum*, de 2.40.

Os índices de velocidade de crescimento de *Scytalidium lignicola* e *Trichoderma* sp. foram similares em todos os tratamentos, exceto no tratamento de 7 mg.L⁻¹ de HgCl₂, no qual *Trichoderma* sp. exibiu IVCM de 6.03, significativamente mais baixo que o IVCM de *Scytalidium* na mesma concentração. Dentre todas as concentrações, o mais alto índice de velocidade de crescimento foi exibido por *Aspergillus fumigatus* (8.50) na concentração de 4 mg.L⁻¹ de HgCl₂. Os maiores índices de velocidade de crescimento na mais alta concentração de HgCl₂ foram exibidos por *Scytalidium lignicola* (7.25), *Trichoderma* sp. (6.03) e *Pestalotiopsis microspora* (3.55).

4. DISCUSSÃO

A prospecção de microrganismos, dentre os quais podemos citar os fungos, em áreas contaminadas por metais pesados, pode ser de grande importância para a compreensão dos mecanismos de tolerância destes seres vivos a estes contaminantes e, principalmente, para se desenvolver estratégias eficientes de biorremediação destas áreas. Neste estudo a distribuição e a frequência de fungos endofíticos foi avaliada em oito espécies de plantas em um local sujeito a contaminação por metais pesados no nordeste brasileiro, assim como a tolerância *in vitro* destes fungos foi testada frente a diferentes concentrações de HgCl₂.

Apesar da existência de contaminação por chumbo, zinco e mercúrio na área da qual as oito plantas desse estudo provêm (CAMPOS et al., 2009), taxa de colonização máxima foi observada em sete destas plantas, o que evidencia a existência de uma comunidade de fungos endofíticos capaz de tolerar as concentrações de metais existentes na área.

A ocorrência de fungos tolerantes em áreas contaminadas com concentrações elevadas de metais pesados é documentada para Cu, Pb, Fe e Hg, metais que podem agir como fator seletivo nesses ambientes contaminados (OLADIPO et al., 2017; FROSSARD et al., 2017). Somente a Morfoespécie de planta 2 exibiu baixa taxa de colonização, possivelmente pela incapacidade dos fungos de superar as barreiras físicas e químicas da planta hospedeira (ARNOLD; HERRE, 2003; SINGH; SHARMA; KUMAR, 2017).

Nesse estudo foram registrados fungos pertencentes a 28 tipos morfológicos distribuídos em 11 gêneros. Cinco morfotipos não puderam ser identificados, pois não produziram estruturas

reprodutivas ou outras características em meio axênico que contribuíssem para a identificação dos mesmos. Provavelmente as condições artificiais de incubação em meio de cultura ou a necessidade de associação com o hospedeiro, não permitiram que a espécie completasse o seu ciclo de vida em cultura axênica. Por sua vez, a identificação por meio de caracteres morfológicos é dificultada pela presença de uma ampla diversidade de fungos endofíticos, muitos dos quais não esporulam em cultura e, portanto, são designados genericamente como *Mycelia sterilia*. (FERNANDES et al., 2015). Por outro lado, existe a falta de conhecimento sobre os variados microhabitats nos hospedeiros, podendo haver muitas espécies inéditas entre os organismos coletados.

Todos os fungos isolados nesse estudo pertenceram ao filo *Ascomycota*. As espécies de fungos endofíticos mais frequentemente registradas para plantas de áreas tropicais, pertencem a esse filo. O maior número de espécies de fungos endofíticos ocorreu na planta pertencente à família Myrtaceae. Estudos mostram que plantas dessa família são importantes fontes de fungos endofíticos, com prevalência de fungos do filo *Ascomycota* (PAULO et al., 2017). O número de espécies isoladas foi similar ao encontrado em estudos com plantas dessa família no Brasil, nos quais já haviam sido identificadas 22 espécies de fungos endofíticos (VAZ et al., 2014). Estudos realizados com plantas dessa família em ambientes com elevada contaminação por metais pesados exibiram alta diversidade de fungos, sendo assim, esse grupo de plantas representa uma fonte valiosa desses organismos endofíticos (WASEEM et al., 2017).

Por outro lado, a baixa diversidade de fungos encontrada em *Eriotheca globosa* pode ser explicada, possivelmente, pela altura da árvore, o que pode dificultar a colonização das folhas dessa espécie arbórea por fungos endofíticos. Estudos evidenciam que fungos endofíticos colonizaram as folhas de *Theobroma cacao* mais intensamente quando estas estavam sob o dossel da floresta do que quando estavam nos locais desobstruídos, refletindo a baixa abundância de propágulos de fungos que possam infectar as plantas nessas áreas abertas (ARNOLD; HERRE, 2003).

É possível verificar que a comunidade de fungos endofíticos tende a ser composta por espécies mais esporádicas e outras mais frequentes, e geralmente estas últimas são generalistas. *Aspergillus fumigatus* foi exclusivamente isolado da Morfoespécie de planta 2, apesar da baixa diversidade e taxa de colonização em comparação às outras plantas desse estudo. Em geral, os

fungos exclusivos apresentaram baixa frequência relativa. Essa especificidade por determinado hospedeiro já foi relatada por meio de estudos que investigam as interações entre plantas de ambientes de mangue e fungos endofíticos associados a raízes (ANANDA e SRIDHAR, 2002).

No presente estudo, somente *Chaetomium globosum* e *Pestalotiopsis microspora* foram isolados de seis das oito plantas amostradas. Esses fungos apresentaram frequências altas em relação aos outros táxons de fungos isolados e não apresentaram especificidade para nenhuma das plantas hospedeiras. É importante destacar que *Chaetomium* spp. são fungos generalistas dos quais existem mais de 350 espécies que garantem proteção às plantas hospedeiras e possivelmente recebem benefícios adaptativos que permitem o estabelecimento em uma ampla variedade de hospedeiros (Zhang et al., 2012). Entre os fungos generalistas e recorrentes destaca-se, também, o gênero *Pestalotiopsis*. Em plantas tropicais, espécies do gênero *Pestalotiopsis* estão entre as mais frequentes (Peixoto Neto et al., 2002; Cannon e Simmons, 2002). O fato de esses grupos serem generalistas pode estar refletindo o sucesso destes táxons em habitar o interior dessas plantas, interferindo assim, na diversidade encontrada em cada espécie.

Já é bem documentada a distribuição típica de fungos endofíticos de plantas de florestas tropicais e temperadas, nos quais poucas espécies desses fungos são frequentes e mais dominantes, enquanto a maioria das espécies apresentam baixas frequências (ARNOLD, 2001; GAMBOA; BAYMAN, 2001; SAUCEDO-GARCIA; ANAYA; ESPINOSA-GARCIA, 2014; GONZÁLEZ-TEUBER; VILO; BASCUÑÁN-GODOY, 2017). Além disso, estudos evidenciam que diferenças particulares na química das folhas podem influenciar a composição das comunidades de endófitos existentes nessas plantas (ARNOLD; HERRE, 2003).

Quando esses fungos foram crescidos em meio contendo HgCl_2 , foi verificado que o sal de mercúrio influenciou o crescimento micelial dos isolados de forma notável. *Chaetomium globosum*, *Chaetomium* sp., *Scytalidium lignicola*, *Pestalotiopsis microspora* e *Trichoderma* sp. apresentaram crescimento micelial até a última concentração de HgCl_2 testada. No entanto, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus tamaritii* foram totalmente inibidas a partir da concentração de 5 mg.L^{-1} de HgCl_2 . Esse efeito inibitório foi diminuído em experimentos anteriores, quando colônias estabelecidas de fungos foram expostas ao composto, ou seja, colônias estabelecidas foram menos afetadas do que colônias jovens expostas ao estresse. Sendo assim, o efeito da adição do metal pesado na expansão radial desses fungos pode depender do

organismo, da concentração do composto testado e do estágio de desenvolvimento da colônia (CRANE; DIGHTON; BARKAY, 2010).

Estudos com diferentes isolados de *Aspergillus flavus* de amostras vegetais de floresta tropical, mostraram sua tolerância e seu uso na degradação de contaminantes de mercúrio no solo. Um desses isolados foi capaz de apresentar crescimento micelial em até 25 mg.L⁻¹ de HgCl₂, uma concentração 6.25 vezes mais alta do que a tolerada pelo isolado *Aspergillus flavus* LS52 do presente estudo. (KURNIATI; ARFARITA; IMAI, 2014). Desse modo, é importante salientar que o efeito do HgCl₂ no crescimento do fungo não só depende da espécie, da idade da colônia e da concentração de HgCl₂ utilizada, mas também das peculiaridades de cada isolado. Sendo assim, um isolado da mesma espécie de fungo endofítico pode apresentar diferentes padrões de crescimento na presença de metais pesados (CHANG; TIAN; LIU, 2016).

Scytalidium spp. é um dos grupos de fungos septados negros mais frequentemente encontrados em estudos sobre organismos resistentes a altas temperaturas. Há evidências de que esses fungos são ecologicamente e economicamente importantes devido à notável resistência a ambientes estressantes (NATVIG; TAYLOR; TSANG, 2015). Além disso, representantes desse grupo foram isolados de soluções ácidas de instalações industriais em uma mina de urânio (SIGLER; CARMICHAEL, 1974). No entanto, pouco se sabia acerca do crescimento desse grupo de fungos na presença de íons de mercúrio até então. *Scytalidium lignicola* foi único fungo a exibir 100% (85 mm) de crescimento radial em todas as concentrações de HgCl₂ no presente estudo. *Trichoderma* sp. apresentou crescimento radial até a concentração de 6 mg.L⁻¹ de HgCl₂; entretanto, na concentração de 7 mg.L⁻¹ de HgCl₂, o fungo não exibiu total colonização das placas, provavelmente pelo início da manifestação dos efeitos tóxicos naquela concentração.

O aumento das doses de HgCl₂ foi inversamente proporcional ao crescimento radial de *A. niger*, *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. fumigatus* e *A. japonicus*, o que pode qualificar o composto de mercúrio como tóxico, além de não essencial para esses isolados, causando uma possível inibição de processos fisiológicos importantes. A acentuada declividade da curva de crescimento micelial exibida por *A. niger* demonstra a peculiaridade que cada isolado pode exibir em relação ao crescimento em ambientes estressantes, uma vez que há relatos de que isolados da mesma

espécie foram capazes de crescer em concentrações muito superiores as utilizadas no presente estudo (IRAM et al. 2013; KURNIATI; ARFARITA; IMAI, 2014).

O padrão de desenvolvimento de fungos na presença de metais pesados pôde ser caracterizado por estágios e mostra os efeitos tóxicos desses metais sobre o crescimento desses organismos. Nesse contexto, o padrão de crescimento característico de fungos na presença de metais pesados é representado por cinco etapas: a fase de atraso, com pouco ou nenhum crescimento; a fase de crescimento acelerado; a fase de crescimento retardado; a fase de crescimento similar, na qual o crescimento do tratamento com metal é similar ao controle e a fase de crescimento aprimorado, na qual a taxa de crescimento pode exceder o crescimento do tratamento controle, o que representa alta tolerância. Estes cinco estágios não são exibidos em todos os fungos, como o observado no presente estudo (VALIX; LOON, 2003; OLADIPO; AWOTOYE; OLAYINKA, 2017).

No presente estudo diferentes espécies de fungos exibem diferentes padrões de tolerância. *Trichoderma* sp. e (LS50) *Scytalidium lignicola* apresentaram as mais altas tolerâncias ao HgCl₂. Esses dados são consistentes com a ideia de que a notável tolerância pode estar ligada a alta produção de melanina e às aceleradas taxas de crescimento (BAN; TANG; CHEN, 2012). A tolerância de *Trichoderma* sp. e *Scytalidium lignicola* a compostos de mercúrio é pouco estudada; no entanto, sabe-se que *Trichoderma* sp. é capaz de tolerar altas concentrações de outro metal tão tóxico quanto o mercúrio, o cádmio (WOLDEAMANUALE, 2017).

Essa tolerância pode ser atribuída às estratégias desenvolvidas pelos isolados para suportar elevadas concentrações desse composto. Sendo assim, alguns mecanismos de tolerância foram relatados, incluindo a precipitação de metal nas paredes celulares, produção de enzimas, sequestro extra e intracelular e efluxo. Entretanto, a aclimatização ao estresse é realizada através de mecanismos intrincados e diversos, inclusive envolvendo múltiplos caminhos fisiológicos e metabólicos complexos ainda pouco estudados (FAZLI et al., 2015; ZHAO; LI; SHEN, 2015; HOQUE; FRITSCHER, 2016).

Pestalotiopsis microspora cresceu sob altas concentrações de 5 mg.L⁻¹ de HgCl₂, mas apresentou índice de tolerância baixo, uma vez que a sua velocidade de crescimento tendeu a diminuir com o incremento das concentrações de HgCl₂, com consequente diminuição da expansão radial nos tratamentos com o composto. A baixa velocidade de crescimento e expansão

radial de *Aspergillus niger* também reflete o baixo índice de tolerância desse isolado. Essas variações de tolerância podem ser explicadas, também, pelas taxas de morte micelial ao longo dos dias (VALIX, LOON, 2003; SABA, THIRUMARIMURUGAN, 2017).

Os altos IVCM's de *Pestalotiopsis microspora* e *Chaetomium* sp. nas concentrações iniciais de HgCl₂ com posterior diminuição dessa velocidade foi similar ao observado em estudos sobre as taxas de crescimento dos fungos endofíticos *Phanerochaete chrysosporium*, *Simplicillium chinense* e *Trichoderma asperellum*, nos quais observou-se que a velocidade de crescimento foi incrementada em baixas concentrações do composto e diminuída progressivamente com maiores concentrações (ZHAO et al., 2016; CHEN; NG; CHEOW, 2017). O elevado IVCM de *P. microspora* no tratamento de 5 mg.L⁻¹ de HgCl₂ foi o responsável pela expansão radial incomum nesse tratamento, com posterior diminuição. O fungo expandiu radialmente a colônia de forma acelerada sem a produção de muita biomassa naquela concentração. Nesse caso, o crescimento foi acelerado e formou-se micélio com pouca densidade de hifas que ocuparam a porção superficial do meio de cultura, o que pode ser indicativo da baixa tolerância desse isolado.

Observou-se um o padrão de desenvolvimento da tolerância dos fungos em estágios ou fases. A presença de contaminação por compostos metálicos perturba a fase inicial de crescimento fúngico, causando o atraso no crescimento do micélio. Em estudos anteriores, HgCl₂ aumentou a fase de lag de *A. flavus* em até 4 dias sob concentrações de 75 mg.L⁻¹ do composto (KURNIATI; ARFARITA; IMAI, 2014). Apesar de nem todos os isolados terem apresentado essa fase, *Aspergillus fumigatus* e *A. tamarisii* tiveram atraso de até 1 dia. Esse atraso é característico da adaptação e desenvolvimento da tolerância de fungos. Mesmo com TI=0 no primeiro dia, esses isolados alcançaram acentuada tolerância rapidamente devido aos seus altos IVCM's, mesmo apresentando inibição total do crescimento nas concentrações mais altas.

O desenvolvimento da tolerância em fases foi menos evidente para *Aspergillus niger*. O mesmo apresentou fase de atraso do desenvolvimento inicial muito longa, de 4 dias. Isso revela que, a maiores concentrações de metal, o comportamento adaptativo do fungo é reduzido (SABA, THIRUMARIMURUGAN, 2017). A variação dos índices de tolerância de isolados do mesmo gênero filogeneticamente próximos, como *Aspergillus niger* (TI=0.07) e *A. japonicus* (TI=0.84) suporta a ideia de que isolados do mesmo gênero não têm necessariamente a mesma

tolerância a metais pesados. Possivelmente, os isolados pouco tolerantes não tiveram o potencial de implantar mecanismos para aliviar a toxicidade do composto, de modo que o crescimento fúngico pudesse continuar sem impedimento na presença de HgCl₂ (IRAM et al., 2013).

Foram observados sintomas visuais de toxidez para *Aspergillus tamaris* na forma de acentuada mudança de pigmentação de verde claro para amarelo claro. De forma similar, colônias de *T. asperellum* formaram colônias brancas em Al e Cr a 2.000 ppm em vez de colônias verdes, e colônias amarelas e brancas na presença de Pb a 1.000 ppm. A possível explicação para estas diferentes alterações morfológicas de pigmentação pode ser devida aos amplos mecanismos de tolerância que cada isolado possui (FAZLI et al., 2015).

Estudos recentes sugerem que a tolerância induzida antes dos isolados serem submetidos a altas concentrações é o primeiro passo para desencadear a tolerância a compostos metálicos. A exposição prolongada a baixas doses pode levar à adaptabilidade às altas concentrações desses compostos, devido à pressão seletiva da exposição em longo prazo. Desse modo, esse mecanismo pode levar à expressão de estratégias de resistência para reduzir o estresse oxidativo, como observado em *Penicillium chrysogenum* (CHEN; NG; CHEOW, 2017).

A diminuição da tolerância nas últimas fases de desenvolvimento pode ser devida à má adaptação do fungo. Os resultados observados sugerem que alguns fungos não exibiram uma boa adaptação à adição de mercúrio ao meio, pois o padrão de crescimento não foi similar aos cinco estágios característicos e os índices de tolerância permaneceram muito menores que 1 para cinco isolados. No entanto, *Trichoderma* sp. e *Scytalidium lignicola* mostraram alta tolerância às concentrações de metal testadas e essas excedem as concentrações observadas no ambiente contaminado de onde esses fungos provêm.

É evidente que esses fungos possuem particularidades morfológicas e fisiológicas que constituem uma importante restrição aos tipos de espécies de plantas e formas possíveis de ocupá-las em locais contaminados. A tolerância claramente ampla desses isolados em relação às condições ambientais estressantes, como os efeitos decorrentes das variações de concentração de mercúrio, pode permitir a esses fungos uma considerável flexibilidade para se adequarem a variações espaciais nos nesses ambientes.

Desenvolver esses mecanismos de sobrevivência sob estresse pode ser uma estratégia complexa, pois os compostos metálicos podem interagir de diversas maneiras com esses fungos.

Estudos prévios apontaram que *Neurospora crassa* apresentou uma taxa de reforço de 25 % de parede celular na presença de cádmio (BHANOORI; VENKATESWERLU, 2000). Ban et al., 2012 mostraram que fungos depositam melanina na parede celular como resposta aos estresses causados por metais pesados no meio. Outras estratégias incluem o incremento da velocidade de crescimento, produção de enzimas e efluxo desses metais. Entretanto, a aclimatização ao estresse é realizada através de mecanismos intrincados e diversos, inclusive envolvendo múltiplos caminhos fisiológicos e metabólicos complexos ainda pouco estudados (FAZLI et al. 2015; ZHAO; LI; SHEN, 2015; HOQUE; FRITSCHER, 2016).

Estudos como esse revelam que áreas contaminadas por resíduos de compostos metálicos podem ser consideradas uma fonte natural preciosa de cepas fúngicas resistentes, que podem ser utilizadas de forma significativa como ferramentas de biorremediação (QAYYUM et al., 2016; GURURAJAN, PRASANNA, 2017; MOHAMMADIAN et al., 2017). O estudo da tolerância de fungos endofíticos é crucial para a descoberta de fungos com habilidades para sobreviver em concentrações extremamente altas de compostos metálicos; desse modo, esses fungos podem ser aplicáveis isoladamente para sistemas remediativos em ambientes contaminados por meio de processos de bioabsorção (BANO et al., 2018; GURURAJAN, BELUR, 2017; LI, ZHANG, SHENG, HUI, 2018) ou em associação com as plantas hospedeiras para melhorar a eficiência de processos de fitorremediação ou fitoestabilização de solos contaminados (KHAN et al., 2017). Isso implica que quanto mais rapidamente os fungos podem se adaptar e desenvolver suas colônias em ambientes poluídos, mais benéficos eles serão para os processos de biorremediação, o que representa uma solução ambiental econômica para a remoção de metais pesados do ambiente.

5. CONCLUSÕES

Altas frequências e taxas de colonização foram observadas nas plantas amostradas, o que evidencia a existência de uma comunidade de fungos endofíticos resistente à contaminação por chumbo, zinco e mercúrio existente na área. Desse modo, as plantas desse ambiente contaminado apresentaram uma comunidade de fungos endofíticos particularmente tolerantes a estes metais. Os fungos endofíticos isolados dessas plantas exibem uma boa plasticidade para a adaptação em ambientes estressantes na presença de HgCl_2 , com um possível aumento na velocidade de crescimento quando expostos a elevadas concentrações do composto. *Scytalidium lignicola* e *Trichoderma* sp. apresentaram alta tolerância e crescimento elevado em meios contendo altas concentrações de HgCl_2 , indicando a possibilidade do uso desses fungos em trabalhos de biorremediação de ambientes contaminados. Ademais, este trabalho demonstra que os locais contaminados, como o Aterro da Ribeira podem consistir em uma ótima fonte de microrganismos para estudos de biorremediação, tendo em vista que a região atua selecionando os microrganismos tolerantes aos poluentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Eduardo B. de Almeida Jr e a equipe do Laboratório de Estudos Botânicos do Departamento de Biologia da UFMA pela identificação das plantas coletadas e pela parceria nas expedições de coleta; a Prof^a. Dr^a. Geusa Felipa de Barros Bezerra pela utilização das dependências do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA/UFMA) e por todo o suporte técnico e intelectual na condução do trabalho; ao biólogo Alexandre Santana Azevedo pelo suporte nas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

Arnold, A.E., 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol Rev.* 21, 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>

Arnold, A.E., Herre, E. A., 2003. Canopy Cover and Leaf Age Affect Colonization by Tropical Fungal Endophytes: Ecological Pattern and Process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia.* 95, n. 3, 388-398. <http://doi.org/10.2307/3761880>

Azevedo, J.L., 2014. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. *Microbial Diversity And Biotechnology In Food Security.* 17-22. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_2

Ban, Y., et al., 2017. Effect of Dark Septate Endophytic Fungus *Gaeumannomyces cylindrosporus* on Plant Growth, Photosynthesis and Pb Tolerance of Maize (*Zea mays* L.). *Pedosphere.* 27, n. 2, 283-292. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60316-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60316-3)

Ban, Y., et al., 2012. The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture. *Plos One.* 7, n. 10, 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047968>

Barnett, H.L., Hunter, B.B., 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi.* Kew: Burgess Publishing Company.

Bano, A., Hussain, J., Akbar, A., Mehmood, K., Anwar, M., Sharif H.M., Ullah, S., Sajid, S., Ali, L., 2018. Biosorption of heavy metals by obligate halophilic fungi. *Chemosphere.* 199, 218-222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.043>

Bourceret, A., et al., 2016. The Bacterial and Fungal Diversity of an Aged PAH- and Heavy Metal-Contaminated Soil is Affected by Plant Cover and Edaphic Parameters. *Microbial Ecology.* 71, n. 3, 711-724. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0682-8>.

Campos, A.E.C., Nunes, G.S., De Oliveira, J.C.S., 2009. Avaliação da contaminação do Igarapé do Sabino (Bacia do Rio Tibiri) por metais pesados, originados dos resíduos e efluentes do Aterro da Ribeira, em São Luís, Maranhão. *Química Nova, São Paulo.* 32, n. 4, 960-964. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000400025>

Castellani, A., 1967. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in distilled water: further researches. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, Mclean. 70, 181-184.

Crane, S., Dighton, J., Barkay, T., 2010. Growth responses to and accumulation of mercury by ectomycorrhizal fungi. *Fungal Biology*. 114, n. 10, 873-880. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.004>.

Chen, S.H., Ng, S.L., Cheow, Y.L., 2017. A novel study based on adaptive metal tolerance behavior in fungi and SEM-EDX analysis. *Journal Of Hazardous Materials*. 334, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.004>

Chang, F., Tian, C., LIU, S., 2016. Discrepant hexavalent chromium tolerance and detoxification by two strains of *Trichoderma asperellum* with high homology. *Chemical Engineering Journal*. 298, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.023>

De Hoog, G.S., GUARRO, J.J., Gene, J., Figueiras, M., 2000. *Atlas of clinical fungi*, second ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Dugan, M.F., 2006. *The Identification of Fungi: An Illustrated Introduction with Keys, Glossary, and Guide to Literature*. American Phytopathological Society, St. Paul. Minnesota. p. 184.

Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Macrozoneamento Ecológico Econômico do Estado do Maranhão. Disponível em: <https://www.cnpm.embrapa.br/projetos/macrozee/fts/data/usodaterra/1.jpg>. Acessado em: 10.08.2016.

Fazli, M.M., Soleimani, N., Mehrasbi, M., 2015. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *Journal Of Environmental Health Science And Engineering*. 13, n. 1, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0176-0>

Frossard, A., Hartmann, M., Frey, B., 2017. Tolerance of the forest soil microbiome to increasing mercury concentrations. *Soil Biology And Biochemistry*. 105, 162-176. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.016>

- Fernandes, E. G., Pereira, O. L., Silva, C. C., 2015. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. Microbiological Research. 181, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.010>
- Falandysz, Jerzy., et al., 2015. Evaluation of Mercury Contamination in Fungi Boletus Species from Latosols, Lateritic Red Earths, and Red and Yellow Earths in the Circum-Pacific Mercuriferous Belt of Southwestern China. Plos One. 10, n. 11, 1-11, 25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143608>
- Faeth, S.H., Fagan W.F., 2002. Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists. Integrative And Comparative Biology, Tempe. 42, n. 2, 360-368. <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.360>.
- Fazli, M.M., et al., 2015. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. Journal Of Environmental Health Science And Engineering. 13, n. 1, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0176-0>
- Gururajan, K.B., Prasanna D., 2017. Screening and selection of indigenous metal tolerant fungal isolates for heavy metal removal. Environmental Technology & Innovation. 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.11.001>
- González-Teuber, M., Vilo, C., Bascuñán-Godoy, L., 2017. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. Genomics Data. 11, 109-112. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.12.015>
- Gamboa, M.A., Bayman P., 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). Biotropica. 33, 352–360. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2001.tb00187.x>
- Hoque, E., Fritscher, J., 2016. A new mercury-accumulating *Mucor hiemalis* strain EH8 from cold sulfidic spring water biofilms. Microbiologyopen. 5, n. 5, 763-781. <https://doi.org/10.1002/mbo3.368>.
- Iram, Shazia., et al., 2013. Heavy Metal Tolerance of Fungus Isolated from the Soil Contaminated with Sewage and Industrial Wastewater. Polish Journal of Environmental Studies. 22, 691-697.

- Kurniati, E., Arfarita, N., Imai, T., 2014. Potential Use of *Aspergillus Flavus* Strain KRP1 in Utilization of Mercury Contaminant. *Procedia Environmental Sciences*. 20, 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2014.03.032>
- Khan, A.R., Waqas, M., Ullah, I., Khan, A.L., Khan, M.A., Lee, I., Shin, J., 2017. Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. *Environmental And Experimental Botany*. 135, 126-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.03.005>
- Li, H., et al., 2012. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb–Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*, Sl. 5, n. 3, 309-315. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.06.002>
- Li, X., Zhang, D., Sheng, F., Hui, Q., 2018. Adsorption characteristics of Copper (II), Zinc (II) and Mercury (II) by four kinds of immobilized fungi residues. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 147, 357-366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.058>
- Mohammadian, E., Ahari, A. B., Arzanlou, M., 2017. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. *Chemosphere*. 185, 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.022>
- Mukherjee, A.B., Zevenhoven, R.B.J., Hylander, L.D., Bhattacharya, P., 2004. Mercury in waste in the European Union: sources, disposal methods and risks. *Resour Conserv Recycl*. 42, 155–182. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2004.02.009>
- Mishra, H., et al., 2017. A long-term comparative assessment of human health risk to leachate-contaminated groundwater from heavy metal with different liner systems. *Environmental Science And Pollution Research*. 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0717-4>
- Mahbub, K., et al., 2017. Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecological Indicators*. 74, 451-462. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.12.004>
- Natvig, D. O., Taylor, J. W., Tsang, A., 2015. *Mycothermus thermophilus* gen. et comb. nov., a new home for the itinerant thermophile *Scytalidium thermophilum* (*Torula thermophila*). *Mycologia*. 107, n. 2, 319-327. <https://doi.org/10.3852/13-399>
- Oladipo, O. G.; et al., 2017. A. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian Journal Of Microbiology*. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.003>

- Paulo, S. B., et al., 2017. Diversity and distribution of the endophytic fungal community in eucalyptus leaves. *African Journal Of Microbiology Research*. 11, n. 3, 92-105. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8353>
- Petrini, O., Stone, J., Carroll, F.E., 1992. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany*. v. 60, 789-796. <https://doi.org/10.1139/b82-102>
- Qayyum, Sadia., et al., 2016. Isolation and characterization of heavy metal resistant fungal isolates from Industrial soil, China. *Pakistan journal of zoology*. 48.
- Rodriguez, R. J., et al., 2009. Fungal endophytes 3: diversity and functional roles. *New Phytologist*, Seattle. 182, n. 2, 314-330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>.
- Saba, G., Thirumarimurugan, M., Sivakumar, V.M., 2017. Heavy metal tolerance potential of fungus isolated from copper smelting industry. *International Research Journal of Pharmacy*. 8, 120-125. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.086108>
- Sigler, L., Carmichael, J. W., 1974. A new acidophilic *Scytalidium*. *Canadian Journal Of Microbiology*. 20, n. 2, 267-268. <https://doi.org/10.1139/m74-043>
- Shahabivand, S., Parvaneh, A., Aliloo, Ali A., 2017. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* affected growth, cadmium partitioning and chlorophyll fluorescence of sunflower under cadmium toxicity. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 145, 496-502. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.064>
- Souza, V.C., Lorenzi, H., 2012. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG III*. terceira ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 768p.
- Saucedo-García, A., Anaya, A.L., Espinosa-García, F.J., 2014. Diversity and Communities of Foliar Endophytic Fungi from Different Agroecosystems of *Coffea arabica* L. in Two Regions of Veracruz, Mexico. *Plos One*. 9, n. 6, 1-11.
- Singh, D.K., et al., 2017. Diversity of endophytic mycobiota of tropical tree *Tectona grandis* Linn.f.: Spatiotemporal and tissue type effects. *Scientific Reports*. 7, n. 1, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098454>

- Unterseher, M., Schnittler M., 2010. Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecol.* 3, 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.03.001>
- Valix, M., Loon, L.O., 2003. Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals. *Minerals Engineering.* 16, 193-198. [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(03)00004-9)
- Vaz, A. B.M., Fontenla, S., Rocha, F. S., 2014. Fungal endophyte β -diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). *Fungal Ecology.* 8, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.12.008>
- Zhao, M., Zhang, C., Zeng, G., 2016. Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in *Phanerochaete chrysosporium*. *Transactions Of Nonferrous Metals Society Of China.* 26, n. 5, 1410-1418. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(16\)64245-0](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(16)64245-0)
- Zhao, Dake; et al., 2015. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data. *Microbiological Research.* 170, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.005>
- Zapotoczny, S., et al., 2007. Accumulation of copper by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. *Microbiological Research, Poland.* 162, n.3, 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.008>
- Waseem, Muhammad; et al., 2017. Ectomycorrhizal fungal diversity associated with endemic *Tristaniopsis* spp. (Myrtaceae) in ultramafic and volcano-sedimentary soils in New Caledonia. *Mycorrhiza.* 27, n. 4, 407-413. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0761-4>
- Woldeamanuale, T. B., 2017. Isolation, Screening and Identification of Cadmium Tolerant Fungi and Their Removal Potential, *Journal of Forensic Sciences.* 1-7.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta é a primeira vez que uma pesquisa associa fungos endofíticos de regiões tropicais brasileiras a sua habilidade de tolerar metais pesados. A diversidade destes fungos endofíticos em plantas na área localizada às margens do Igarapé do Sabino, MA, foi avaliada e descrita (dados não apresentados). Os resultados preliminares estão em anexo e farão parte de outro manuscrito ainda em fase de elaboração, mas podem auxiliar na compreensão do artigo principal apresentado nesta dissertação.

Levando em consideração a escassez de trabalhos desse tipo especialmente para o estado do Maranhão, conhecido pela sua riqueza de ambientes naturais e extensa biodiversidade, o ineditismo dos resultados aqui apresentados representam um início promissor de uma linha de pesquisa já bastante explorada em todo mundo: a prospecção e a utilização de microrganismos como agentes de biorremediação.

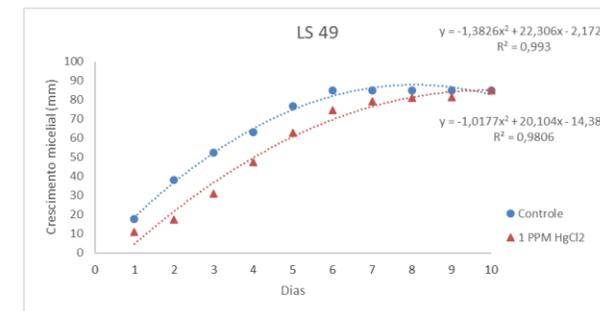
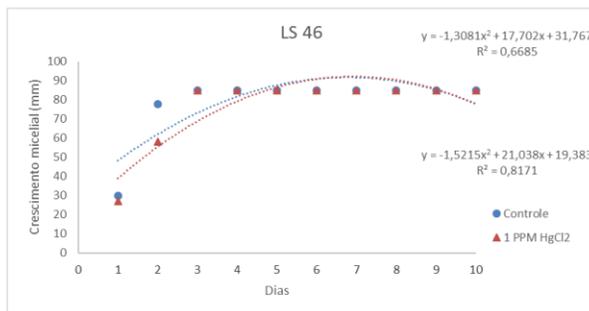
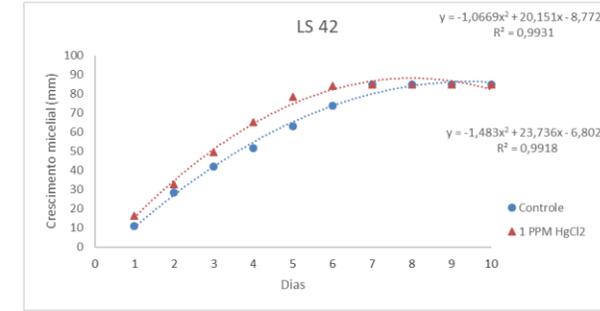
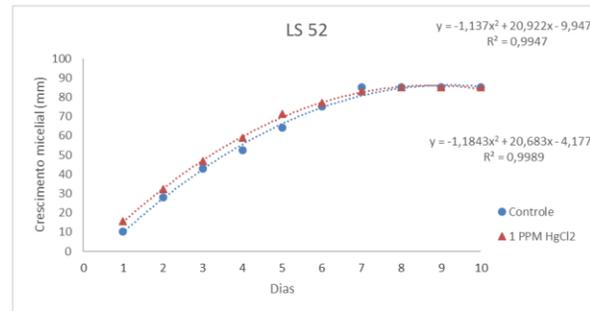
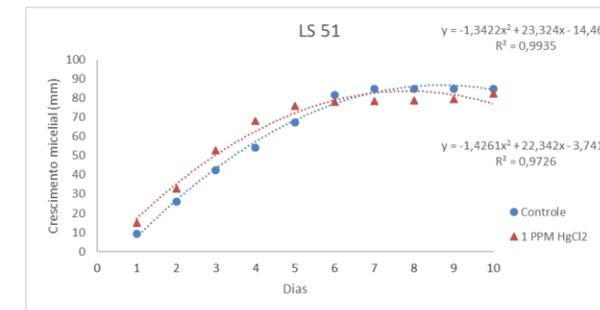
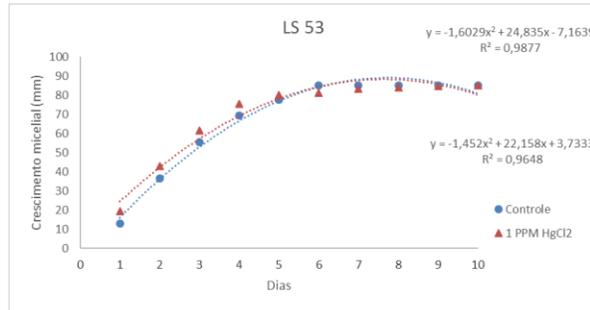
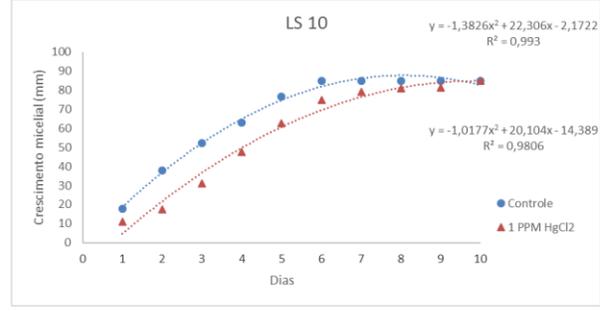
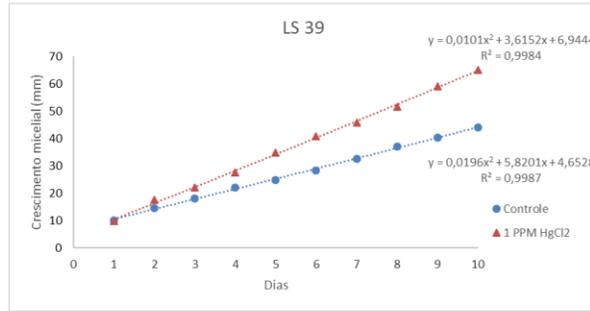
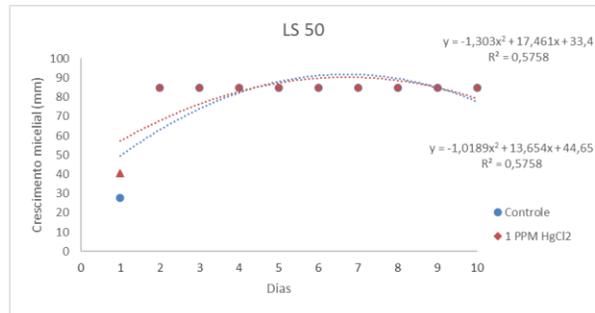
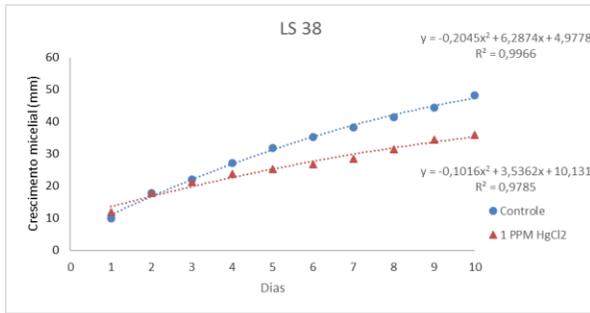
Alguns dos isolados fúngicos utilizados neste trabalho, principalmente *Scytalidium lignicola* e *Trichoderma* sp., se apresentam como promissores agentes de biorremediação. Para que isso ocorra de fato, estudos complementares estão sendo planejados no sentido de se compreender as bases bioquímicas dessa tolerância, como por exemplo, tentando descobrir se há um aparato enzimático capaz de degradar os metais pesados ou se estes são bioacumulados pelos fungos. Além disso, estes fungos estão preservados em coleção e disponível aos pesquisadores das mais diversas áreas para estudos futuros, haja visto os resultados demonstrados até o momento.

Apesar dos resultados serem ainda basais, muitos outros estudos podem ser planejados a partir dele. Uma linha de pesquisa pode investir em estudos capazes de compreender os mecanismos intrínsecos dessa relação planta/fungo e como a tolerância desses fungos ao metal influencia nesse sistema biológico. Outros estudos podem tentar elucidar ainda mais por métodos mais robustos a biodiversidade fúngica da região, ou mesmo testar esses fungos promissores apresentados aqui frente a outros xenobióticos. Num ponto de vista ainda mais aplicado, pesquisas poderiam tentar descobrir uma maneira viável de se utilizar estes microrganismos em áreas contaminadas.

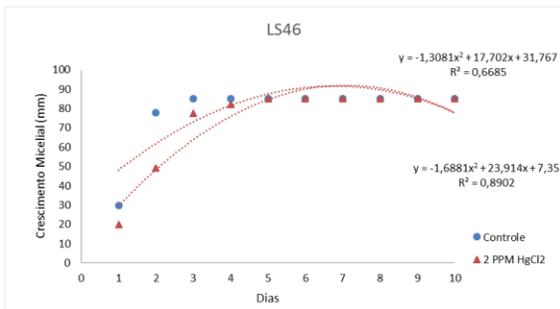
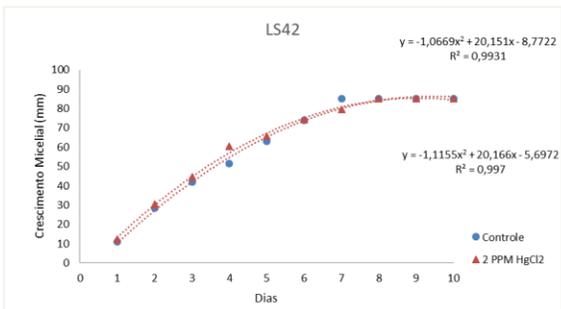
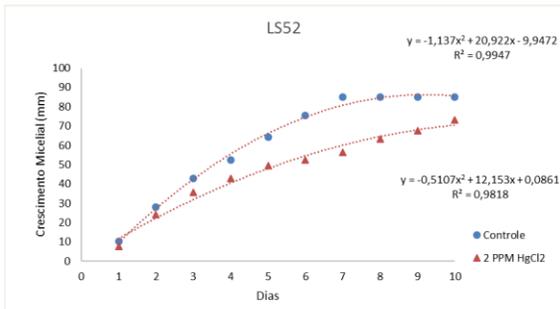
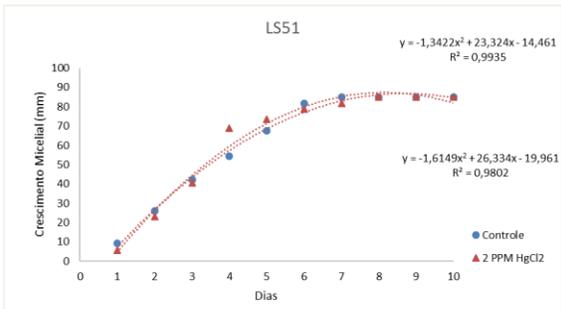
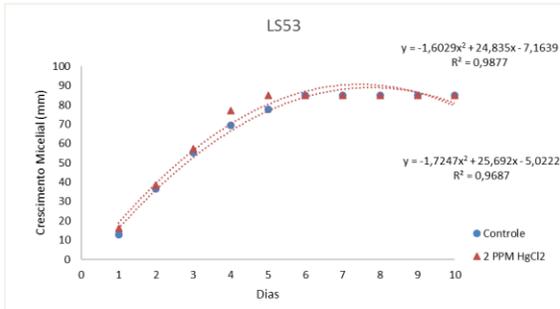
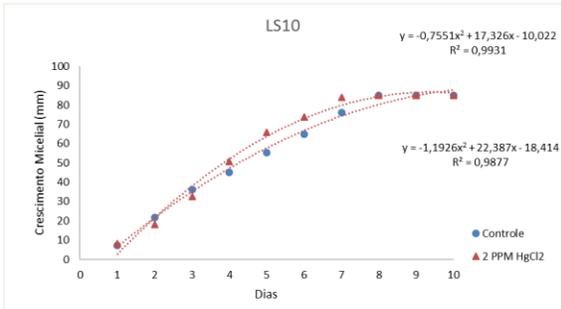
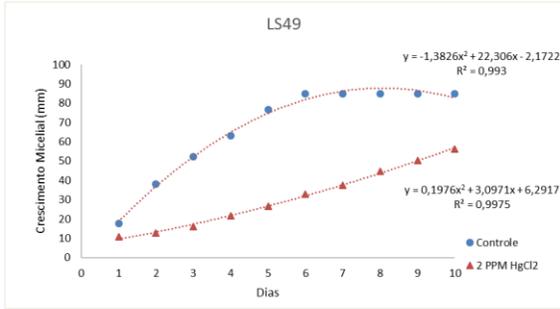
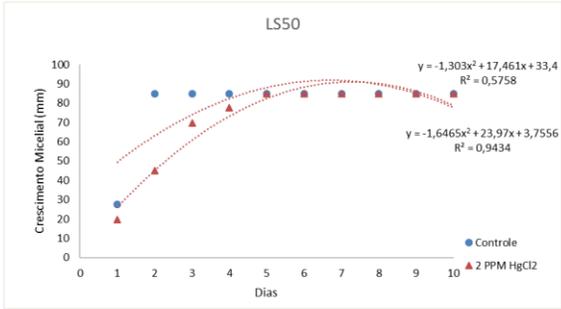
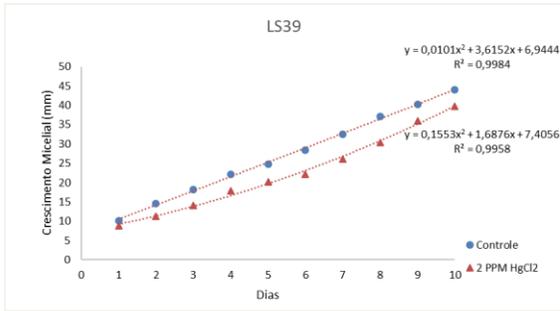
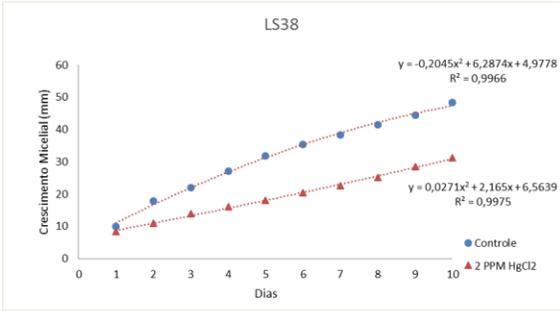
ANEXO 1

Planilhas de dados de crescimento micelial e gráficos de regressão para cada concentração de HgCl_2 avaliadas.

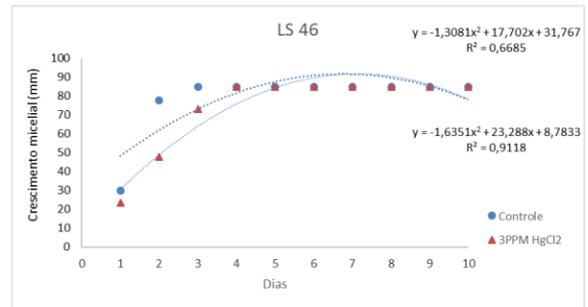
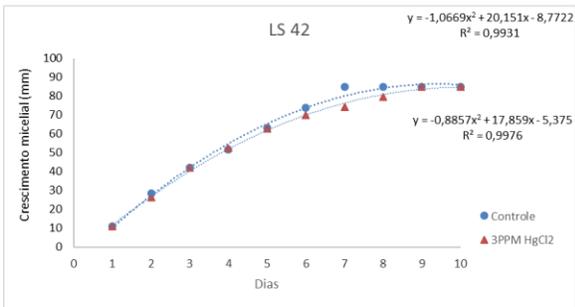
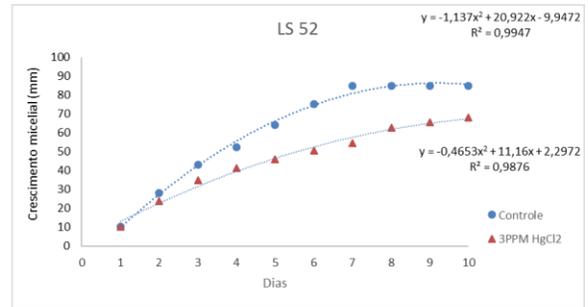
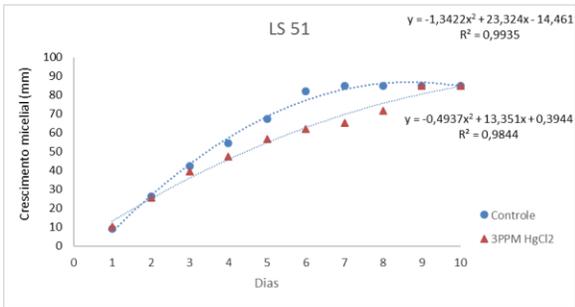
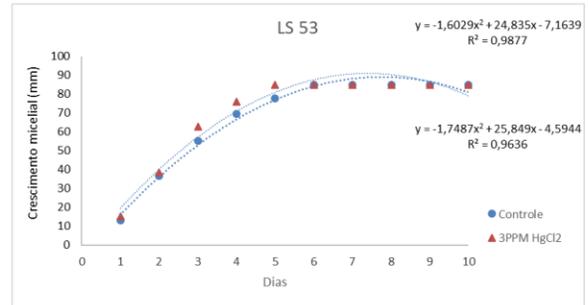
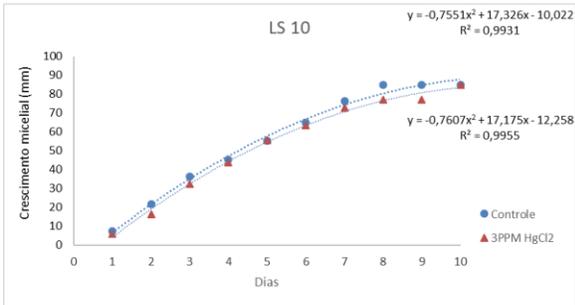
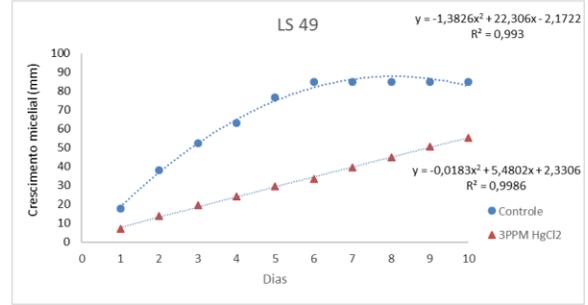
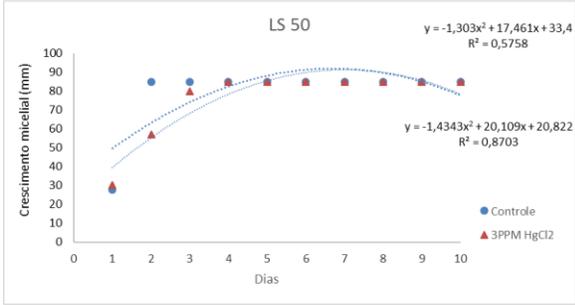
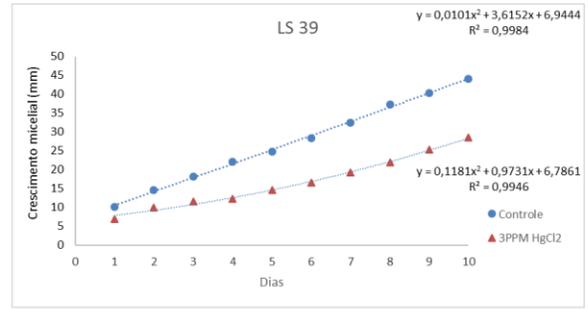
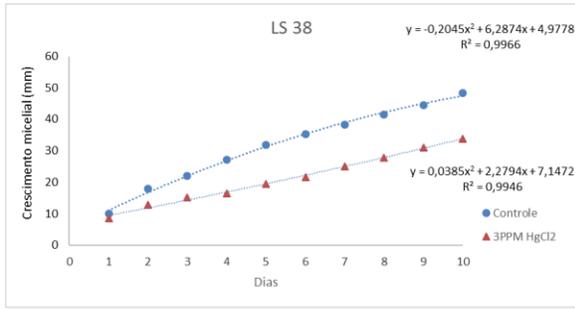
ID	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	IVCM
LS38	CT	1	9,5	15,5	21	24	27	30	33	35	39,5	44,5	3,5
LS38	CT	2	10,5	18	22,5	28	32,5	35,5	37,5	40,5	42,5	46	3,55
LS38	CT	3	10	20	22,5	29,5	36	40,5	44,5	49	51,5	54,5	4,45
		MEDIA	10	17,83333	22	27,16667	31,83333	35,33333	38,33333	41,5	44,5	48,33333	3,833333
LS38	1	1	12	16,5	19,5	22,5	23,5	25,5	27,5	30	33	35	2,3
LS38	1	2	11,5	17,5	19,5	20,5	22	23,5	25	28,5	31,5	32,5	2,1
LS38	1	3	12	19,5	24,5	28	30,5	31	33	36	38,5	40	2,8
		MEDIA	11,83333	17,83333	21,16667	23,66667	25,33333	26,66667	28,5	31,5	34,33333	35,83333	2,4
LS39	CT	1	10,5	15,5	19	22,5	25,5	28,5	33	37,5	41	45	3,45
LS39	CT	2	10	14	18	22,5	25	29,5	33,5	39	43	47	3,7
LS39	CT	3	10	14	17,5	21,5	24	27	31	35	37	40	3
		MEDIA	10,16667	14,5	18,16667	22,16667	24,83333	28,33333	32,5	37,16667	40,33333	44	3,383333
LS39	1	1	8,5	22,5	27,5	33,5	42	49	55	62	70	77	6,85
LS39	1	2	10,5	17,5	22,5	29,5	37,5	44	49	55,5	64	70,5	6
LS39	1	3	10,5	12,5	16	20	25	29,5	33,5	37,5	43	47,5	3,7
		MEDIA	9,833333	17,5	22	27,66667	34,83333	40,83333	45,83333	51,66667	59	65	5,516667
LS50	CT	1	26	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,9
LS50	CT	2	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
LS50	CT	3	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
		MEDIA	27,66667	85	5,733333								
LS50	1	1	42	85	85	85	85	85	85	85	85	85	4,3
LS50	1	2	38,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	4,65
LS50	1	3	40	85	85	85	85	85	85	85	85	85	4,5
		MEDIA	40,16667	85	4,483333								
LS49	CT	1	16	36,5	51,5	63	75	85	85	85	85	85	6,9
LS49	CT	2	19,5	39	54,5	66	80	85	85	85	85	85	6,55
LS49	CT	3	18	38,5	51	60	75	85	85	85	85	85	6,7
		MEDIA	17,83333	38	52,33333	63	76,66667	85	85	85	85	85	6,716667
LS49	1	1	13	19	34	50,5	65	80	85	85	85	85	7,2
LS49	1	2	9	17,5	31	47	64	71	72	72,5	73,5	85	7,6
LS49	1	3	10,5	15,5	28	45	59	73	80	85	85	85	7,45
		MEDIA	10,83333	17,33333	31	47,5	62,66667	74,66667	79	80,83333	81,16667	85	7,416667
LS10	CT	1	8	22	36	45,5	55	65	75	85	85	85	7,7
LS10	CT	2	7	21	36	45	55	65	76,5	85	85	85	7,8
LS10	CT	3	7	22	37	45	56	65	77	85	85	85	7,8
		MEDIA	7,333333	21,66667	36,33333	45,16667	55,33333	65	76,16667	85	85	85	7,766667
LS10	1	1	9	21,5	42,5	60,5	80	85	85	85	85	85	7,6
LS10	1	2	9,5	25	45	61	75	85	85	85	85	85	7,55
LS10	1	3	9	25	43,5	63,5	80	85	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	9,166667	23,83333	43,66667	61,66667	78,33333	85	85	85	85	85	7,583333
LS53	CT	1	13	36	55	70	78	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	2	13	37,5	56	70	78,5	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	3	13	36,5	55	68,5	76,5	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	13	36,66667	55,33333	69,5	77,66667	85	85	85	85	85	7,2
LS53	1	1	19	42	54	63	70	73	80	82	84	85	6,6
LS53	1	2	20	43	63	78	85	85	85	85	85	85	6,5
LS53	1	3	19,5	43,5	67	85	85	85	85	85	85	85	6,55
		MEDIA	19,5	42,83333	61,33333	75,33333	80	81	83,33333	84	84,66667	85	6,55
LS51	CT	1	10	27	43	55	69,5	85	85	85	85	85	7,5
LS51	CT	2	9	25,5	42	53	65	75,5	85	85	85	85	7,6
LS51	CT	3	9	26	42	55	68	85	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	9,333333	26,16667	42,33333	54,33333	67,5	81,83333	85	85	85	85	7,566667
LS51	1	1	15	33	54	78	85	85	85	85	85	85	7
LS51	1	2	15	33	52,5	60	63	64	65	67	69	77,5	6,25
LS51	1	3	15	33	52	66	80	85	85	85	85	85	7
		MEDIA	15	33	52,83333	68	76	78	78,33333	79	79,66667	82,5	6,75
LS52	CT	1	12	29,5	44	54	65,5	75	85	85	85	85	7,3
LS52	CT	2	10	28	43	52	64	75	85	85	85	85	7,5
LS52	CT	3	9	27	42	51,5	63	76	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	10,33333	28,16667	43	52,5	64,16667	75,33333	85	85	85	85	7,466667
LS52	1	1	15,5	32	47,5	62	75	80	83	85	85	85	6,95
LS52	1	2	15,5	32	46	57	69	75	82	85	85	85	6,95
LS52	1	3	16	32,5	46,5	58	70	76	84	85	85	85	6,9
		MEDIA	15,66667	32,16667	46,66667	59	71,33333	77	83	85	85	85	6,933333
LS42	CT	1	11	28,5	42,5	52,5	66	77	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	2	11	28,5	42	51	61,5	71,5	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	3	11	28	41,5	51,5	61,5	73	85	85	85	85	7,4
		MEDIA	11	28,33333	42	51,66667	63	73,83333	85	85	85	85	7,4
LS42	1	1	17	32	48	62	77,5	82	85	85	85	85	6,8
LS42	1	2	16	32	50	68	82,5	85	85	85	85	85	6,9
LS42	1	3	16	34,5	51	65,5	75,5	85	85	85	85	85	6,9
		MEDIA	16,33333	32,83333	49,66667	65,16667	78,5	84	85	85	85	85	6,866667
LS46	CT	1	31	80	85	85	85	85	85	85	85	85	5,4
LS46	CT	2	29,5	78,5	85	85	85	85	85	85	85	85	5,55
LS46	CT	3	29	75	85	85	85	85	85	85	85	85	5,6
		MEDIA	29,83333	77,83333	85	5,516667							
LS46	1	1	21,5	50	85	85	85	85	85	85	85	85	6,35
LS46	1	2	29,5	62,5	85	85	85	85	85	85	85	85	5,55
LS46	1	3	30	62	85	85	85	85	85	85	85	85	5,5
		MEDIA	27	58,16667	85	5,8							



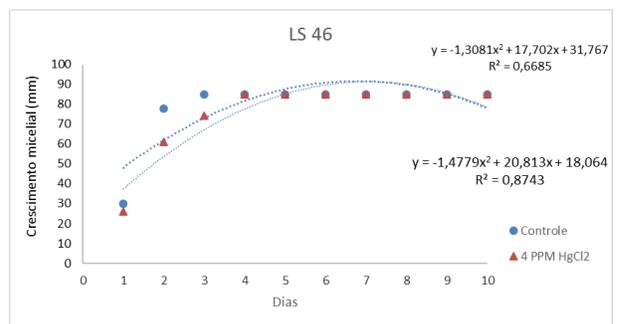
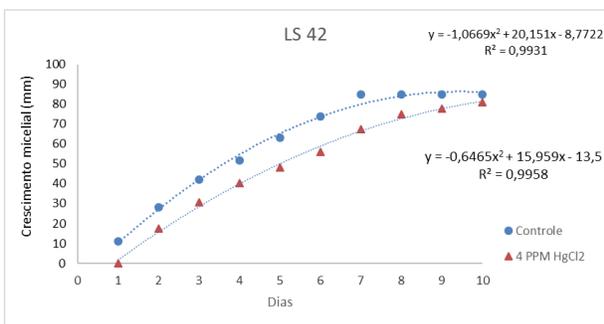
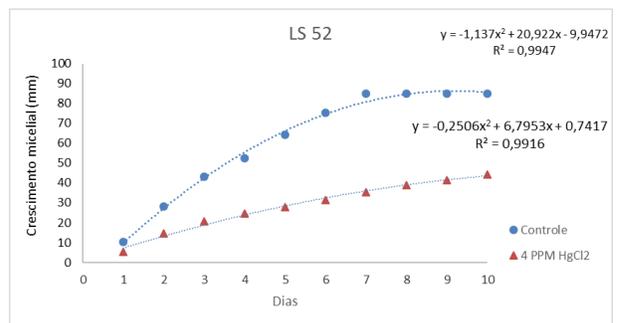
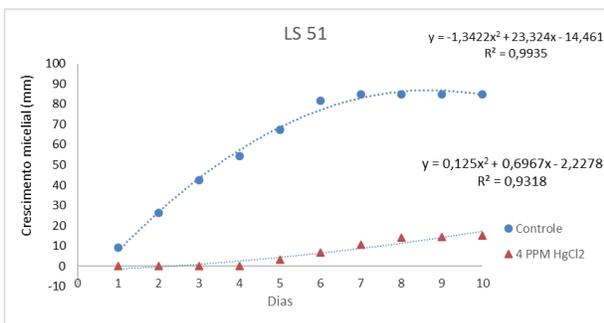
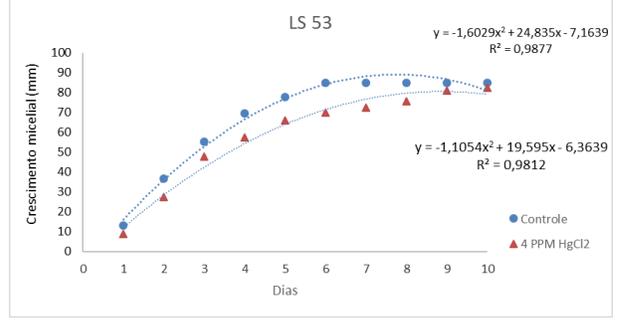
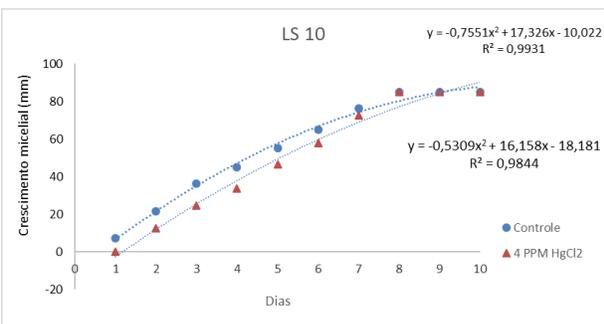
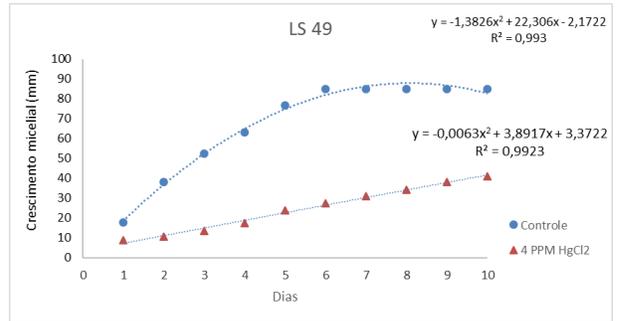
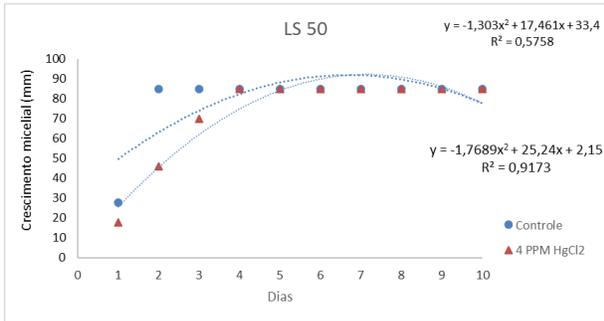
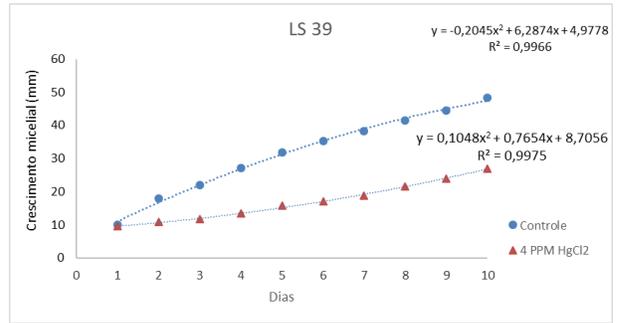
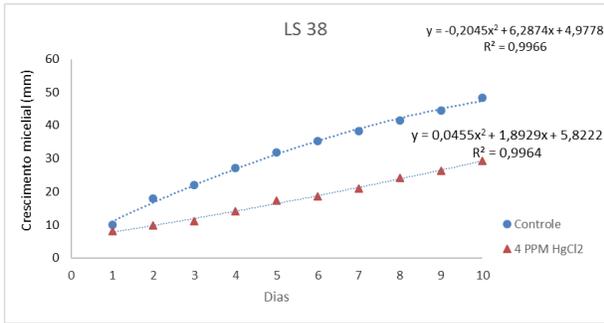
ID	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	IVCM
LS38	CT	1	9,5	15,5	21	24	27	30	33	35	39,5	44,5	3,5
LS38	CT	2	10,5	18	22,5	28	32,5	35,5	37,5	40,5	42,5	46	3,55
LS38	CT	3	10	20	22,5	29,5	36	40,5	44,5	49	51,5	54,5	4,45
		MEDIA	10	17,83333	22	27,16667	31,83333	35,33333	38,33333	41,5	44,5	48,33333	3,833333
LS38	2	1	8,5	11	13,5	15	16	17,5	18	22	24	26,5	1,8
LS38	2	2	8	11,5	14	17,5	19,5	22	23,5	26,5	30,5	33	2,5
LS38	2	3	8,5	10,5	14	16	18,5	21,5	26,5	27	31	34	2,55
		MEDIA	8,333333	11	13,83333	16,16667	18	20,33333	22,66667	25,16667	28,5	31,16667	2,283333
LS39	CT	1	10,5	15,5	19	22,5	25,5	28,5	33	37,5	41	45	3,45
LS39	CT	2	10	14	18	22,5	25	29,5	33,5	39	43	47	3,7
LS39	CT	3	10	14	17,5	21,5	24	27	31	35	37	40	3
		MEDIA	10,16667	14,5	18,16667	22,16667	24,83333	28,33333	32,5	37,16667	40,33333	44	3,383333
LS39	2	1	8,5	11	13	16	20	22	26	29	35,5	38,5	3
LS39	2	2	9	12	15	18	20	22	26	30	35,5	39	3
LS39	2	3	9	11	14	19,5	20,5	22,5	26,5	32	37	42	3,3
		MEDIA	8,833333	11,33333	14	17,83333	20,16667	22,16667	26,16667	30,33333	36	39,83333	3,1
LS50	CT	1	26	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,9
LS50	CT	2	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
LS50	CT	3	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
		MEDIA	27,66667	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,733333
LS50	2	1	20	47	72,5	78,5	85	85	85	85	85	85	6,5
LS50	2	2	19	45	70	77,5	85	85	85	85	85	85	6,6
LS50	2	3	20	43	66,5	77	85	85	85	85	85	85	6,5
		MEDIA	19,66667	45	69,66667	77,66667	85	85	85	85	85	85	6,533333
LS49	CT	1	16	36,5	51,5	63	75	85	85	85	85	85	6,9
LS49	CT	2	19,5	39	54,5	66	80	85	85	85	85	85	6,55
LS49	CT	3	18	38,5	51	60	75	85	85	85	85	85	6,7
		MEDIA	17,83333	38	52,33333	63	76,66667	85	85	85	85	85	6,716667
LS49	2	1	10	13	15,5	19,5	25	32	35,5	42	48	53,5	4,35
LS49	2	2	10,5	12,5	15	21	25	30	35	39,5	40	45	3,45
LS49	2	3	11,5	13	17,5	24,5	30	36,5	41,5	53	62,5	70,5	5,9
		MEDIA	10,66667	12,83333	16	21,66667	26,66667	32,83333	37,33333	44,83333	50,16667	56,33333	4,566667
LS10	CT	1	8	22	36	45,5	55	65	75	85	85	85	7,7
LS10	CT	2	7	21	36	45	55	65	76,5	85	85	85	7,8
LS10	CT	3	7	22	37	45	56	65	77	85	85	85	7,8
		MEDIA	7,333333	21,66667	36,33333	45,16667	55,33333	65	76,16667	85	85	85	7,766667
LS10	2	1	8,5	16	31	60	65	80	85	85	85	85	7,65
LS10	2	2	8	17	31	47	58	65	81,5	85	85	85	7,7
LS10	2	3	8	21	36	45	75	76	85	85	85	85	7,7
		MEDIA	8,166667	18	32,66667	50,66667	66	73,66667	83,83333	85	85	85	7,683333
LS53	CT	1	13	36	55	70	78	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	2	13	37,5	56	70	78,5	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	3	13	36,5	55	68,5	76,5	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	13	36,66667	55,33333	69,5	77,66667	85	85	85	85	85	7,2
LS53	2	1	17	39	60	79	85	85	85	85	85	85	6,8
LS53	2	2	17	38	60	78	85	85	85	85	85	85	6,8
LS53	2	3	14	38,5	52	74	85	85	85	85	85	85	7,1
		MEDIA	16	38,5	57,33333	77	85	85	85	85	85	85	6,9
LS51	CT	1	10	27	43	55	69,5	85	85	85	85	85	7,5
LS51	CT	2	9	25,5	42	53	65	75,5	85	85	85	85	7,6
LS51	CT	3	9	26	42	55	68	85	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	9,333333	26,16667	42,33333	54,33333	67,5	81,83333	85	85	85	85	7,566667
LS51	2	1	5	22	40	59,5	61	66	75	85	85	85	8
LS51	2	2	8	26,5	43,5	72	80	85	85	85	85	85	7,7
LS51	2	3	4	20,5	38	75	80	85	85	85	85	85	8,1
		MEDIA	5,666667	23	40,5	68,83333	73,66667	78,66667	81,66667	85	85	85	7,933333
LS52	CT	1	12	29,5	44	54	65,5	75	85	85	85	85	7,3
LS52	CT	2	10	28	43	52	64	75	85	85	85	85	7,5
LS52	CT	3	9	27	42	51,5	63	76	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	10,33333	28,16667	43	52,5	64,16667	75,33333	85	85	85	85	7,466667
LS52	2	1	7	23,5	35	39	47	50,5	54,5	61	66,5	70	6,3
LS52	2	2	9,5	25,5	37	45	51	53	56	63	65	75	6,55
LS52	2	3	6,5	23	35	44,5	50	54	59	65,5	71,5	75	6,85
		MEDIA	7,666667	24	35,66667	42,83333	49,33333	52,5	56,5	63,16667	67,66667	73,33333	6,566667
LS42	CT	1	11	28,5	42,5	52,5	66	77	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	2	11	28,5	42	51	61,5	71,5	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	3	11	28	41,5	51,5	61,5	73	85	85	85	85	7,4
		MEDIA	11	28,33333	42	51,66667	63	73,83333	85	85	85	85	7,4
LS42	2	1	13	30	46	67,5	72,5	77,5	85	85	85	85	7,2
LS42	2	2	12,5	31	44	66	70	75	78	85	85	85	7,25
LS42	2	3	12	30	44	48	55	70	76	85	85	85	7,3
		MEDIA	12,5	30,33333	44,66667	60,5	65,83333	74,16667	79,66667	85	85	85	7,25
LS46	CT	1	31	80	85	85	85	85	85	85	85	85	5,4
LS46	CT	2	29,5	78,5	85	85	85	85	85	85	85	85	5,55
LS46	CT	3	29	75	85	85	85	85	85	85	85	85	5,6
		MEDIA	29,83333	77,83333	85	85	85	85	85	85	85	85	5,516667
LS46	2	1	21	51	81	82	85	85	85	85	85	85	6,4
LS46	2	2	20	50	74	81	85	85	85	85	85	85	6,5
LS46	2	3	19	46,5	77,5	83,5	85	85	85	85	85	85	6,6
		MEDIA	20	49,16667	77,5	82,16667	85	85	85	85	85	85	6,5



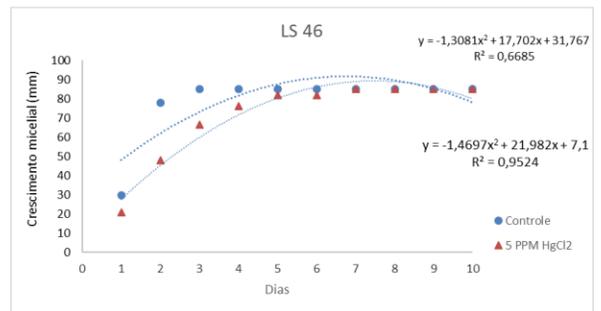
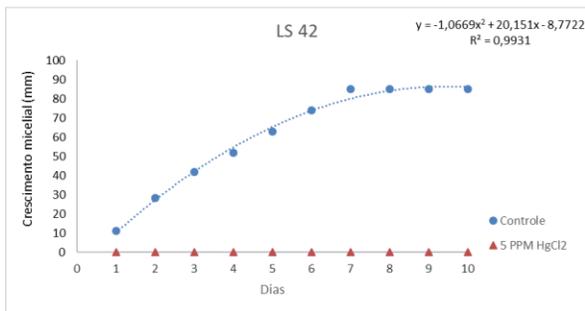
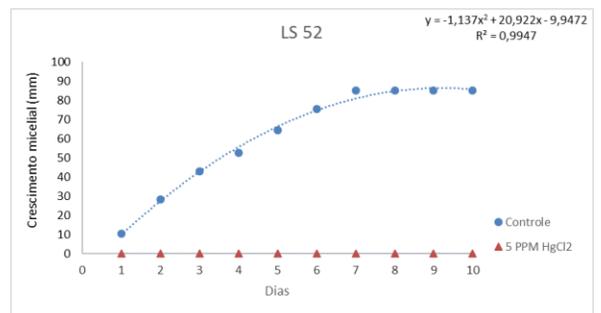
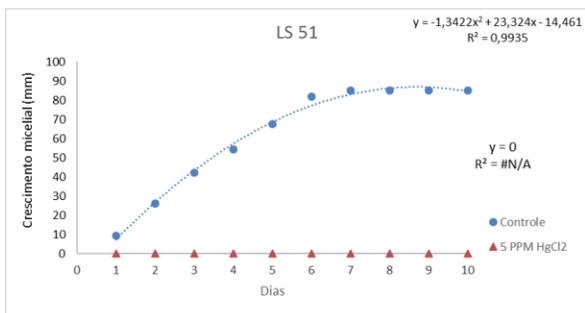
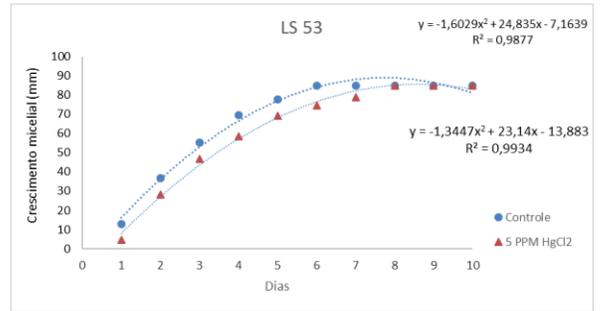
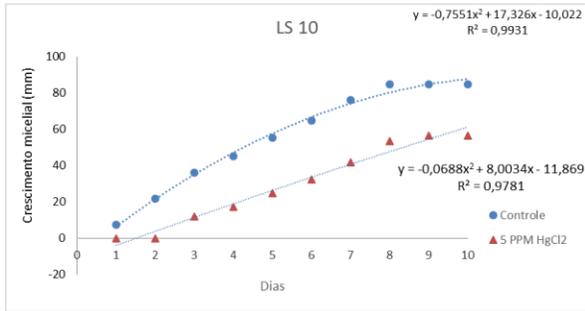
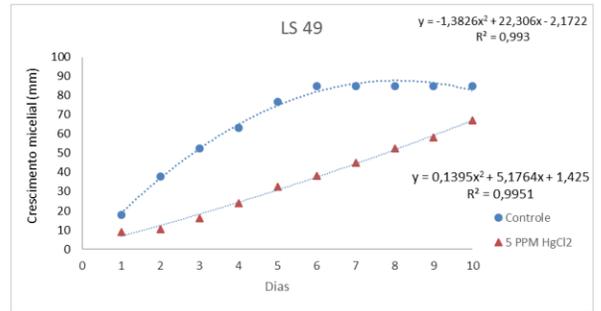
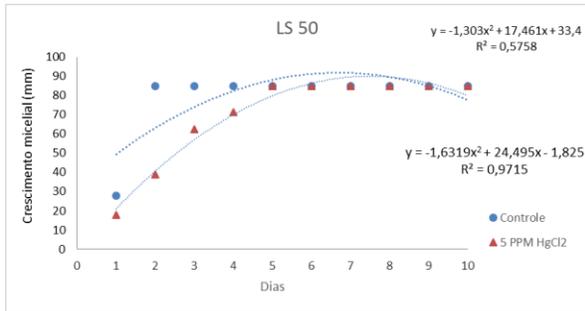
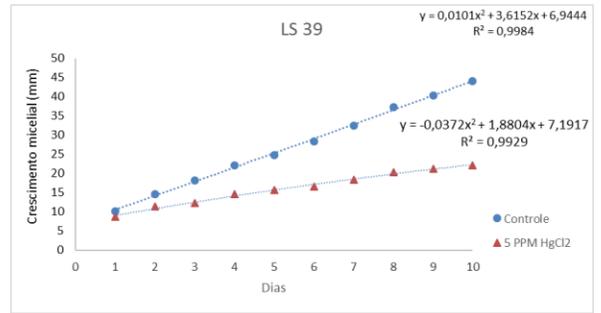
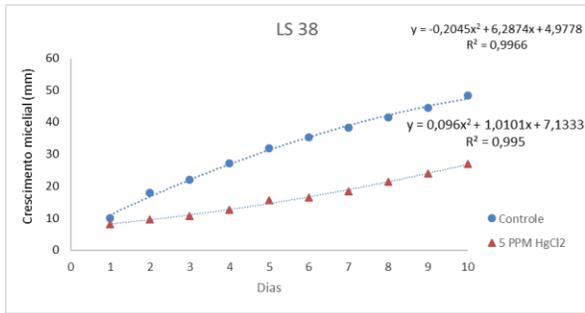
ID	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	IVCM
LS38	CT	1	9,5	15,5	21	24	27	30	33	35	39,5	44,5	3,5
LS38	CT	2	10,5	18	22,5	28	32,5	35,5	37,5	40,5	42,5	46	3,55
LS38	CT	3	10	20	22,5	29,5	36	40,5	44,5	49	51,5	54,5	4,45
		MEDIA	10	17,83333	22	27,16667	31,83333	35,33333	38,33333	41,5	44,5	48,33333	3,833333
LS38	3	1	8	12,5	15,5	16,5	20	22	25	28,5	32,5	34,5	2,65
LS38	3	2	9	13,5	15	17	20	22	25,5	28	31	34	2,5
LS38	3	3	8,5	12,5	15	16	18,5	20,5	24,5	27	29,5	33	2,45
		MEDIA	8,5	12,83333	15,16667	16,5	19,5	21,5	25	27,83333	31	33,83333	2,533333
LS39	CT	1	10,5	15,5	19	22,5	25,5	28,5	33	37,5	41	45	3,45
LS39	CT	2	10	14	18	22,5	25	29,5	33,5	39	43	47	3,7
LS39	CT	3	10	14	17,5	21,5	24	27	31	35	37	40	3
		MEDIA	10,16667	14,5	18,16667	22,16667	24,83333	28,33333	32,5	37,16667	40,33333	44	3,833333
LS39	3	1	6,5	10,5	11,5	12	15	18	19	21	24	25,5	1,9
LS39	3	2	7,5	9,5	12	13	14,5	16	18,5	22	25	28	2,05
LS39	3	3	7	10	11	12	14,5	15,5	20	22,5	27	32	2,5
		MEDIA	7	10	11,5	12,33333	14,66667	16,5	19,16667	21,83333	25,33333	28,5	2,15
LS50	CT	1	26	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,9
LS50	CT	2	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
LS50	CT	3	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
		MEDIA	27,66667	85	5,733333								
LS50	3	1	30	58	81,5	85	85	85	85	85	85	85	5,5
LS50	3	2	31	57,5	77,5	85	85	85	85	85	85	85	5,4
LS50	3	3	30	55,5	80	85	85	85	85	85	85	85	5,5
		MEDIA	30,33333	57	79,66667	85	5,466667						
LS49	CT	1	16	36,5	51,5	63	75	85	85	85	85	85	6,9
LS49	CT	2	19,5	39	54,5	66	80	85	85	85	85	85	6,55
LS49	CT	3	18	38,5	51	60	75	85	85	85	85	85	6,7
		MEDIA	17,83333	38	52,33333	63	76,66667	85	85	85	85	85	6,716667
LS49	3	1	7	13,5	19	23	29,5	33,5	37,5	41,5	47,5	50,5	4,35
LS49	3	2	7	13	18,5	22,5	27	30,5	36	40,5	44,5	48,5	4,15
LS49	3	3	7	14,5	21	26,5	32,5	36,5	45	52,5	60	67	6
		MEDIA	7	13,66667	19,5	24	29,66667	33,5	39,5	44,83333	50,66667	55,33333	4,833333
LS10	CT	1	8	22	36	45,5	55	65	75	85	85	85	7,7
LS10	CT	2	7	21	36	45	55	65	76,5	85	85	85	7,8
LS10	CT	3	7	22	37	45	56	65	77	85	85	85	7,8
		MEDIA	7,333333	21,66667	36,33333	45,16667	55,33333	65	76,16667	85	85	85	7,766667
LS10	3	1	6	17	33	47	55	63	65	60,5	61,5	85	7,9
LS10	3	2	6	14	29,5	40	53	61	75	85	85	85	7,9
LS10	3	3	6	18,5	34,5	44	58,5	66,5	78	85	85	85	7,9
		MEDIA	6	16,5	32,33333	43,66667	55,5	63,5	72,66667	76,83333	77,16667	85	7,9
LS53	CT	1	13	36	55	70	78	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	2	13	37,5	56	70	78,5	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	3	13	36,5	55	68,5	76,5	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	13	36,66667	55,33333	69,5	77,66667	85	85	85	85	85	7,2
LS53	3	1	15	40	60	74	85	85	85	85	85	85	7
LS53	3	2	16	38,5	63,5	76	85	85	85	85	85	85	6,9
LS53	3	3	15	37	64,5	78	85	85	85	85	85	85	7
		MEDIA	15,33333	38,5	62,66667	76	85	85	85	85	85	85	6,966667
LS51	CT	1	10	27	43	55	69,5	85	85	85	85	85	7,5
LS51	CT	2	9	25,5	42	53	65	75,5	85	85	85	85	7,6
LS51	CT	3	9	26	42	55	68	85	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	9,333333	26,16667	42,33333	54,33333	67,5	81,83333	85	85	85	85	7,566667
LS51	3	1	11	25	39	46	55,5	62,5	66	75	85	85	7,4
LS51	3	2	10	27,5	41,5	49	57,5	63	65,5	69	85	85	7,5
LS51	3	3	10	24	38,5	47	56,5	61	64	70,5	85	85	7,5
		MEDIA	10,33333	25,5	39,66667	47,33333	56,5	62,16667	65,16667	71,5	85	85	7,466667
LS52	CT	1	12	29,5	44	54	65,5	75	85	85	85	85	7,3
LS52	CT	2	10	28	43	52	64	75	85	85	85	85	7,5
LS52	CT	3	9	27	42	51,5	63	76	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	10,33333	28,16667	43	52,5	64,16667	75,33333	85	85	85	85	7,466667
LS52	3	1	10	23,5	35	41,5	46	49,5	52	56,5	59	63,5	5,35
LS52	3	2	10	24	35	41	47	52	60	77	80	80	7
LS52	3	3	10,5	24	35	41	45	50	51,5	55	58	60,5	5
		MEDIA	10,16667	23,83333	35	41,16667	46	50,5	54,5	62,83333	65,66667	68	5,783333
LS42	CT	1	11	28,5	42,5	52,5	66	77	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	2	11	28,5	42	51	61,5	71,5	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	3	11	28	41,5	51,5	61,5	73	85	85	85	85	7,4
		MEDIA	11	28,33333	42	51,66667	63	73,83333	85	85	85	85	7,4
LS42	3	1	10	26	42	51	60,5	67	68,5	71	85	85	7,5
LS42	3	2	10,5	26	42	53	63,5	71	78	85	85	85	7,45
LS42	3	3	12	26,5	42	53	64	72	75,5	82,5	85	85	7,3
		MEDIA	10,83333	26,16667	42	52,33333	62,66667	70	74	79,5	85	85	7,416667
LS46	CT	1	31	80	85	85	85	85	85	85	85	85	5,4
LS46	CT	2	29,5	78,5	85	85	85	85	85	85	85	85	5,55
LS46	CT	3	29	75	85	85	85	85	85	85	85	85	5,6
		MEDIA	29,83333	77,83333	85	5,516667							
LS46	3	1	23	45,5	69	85	85	85	85	85	85	85	6,2
LS46	3	2	23	47,5	75	85	85	85	85	85	85	85	6,2
LS46	3	3	24,5	50	75	85	85	85	85	85	85	85	6,05
		MEDIA	23,5	47,66667	73	85	6,15						



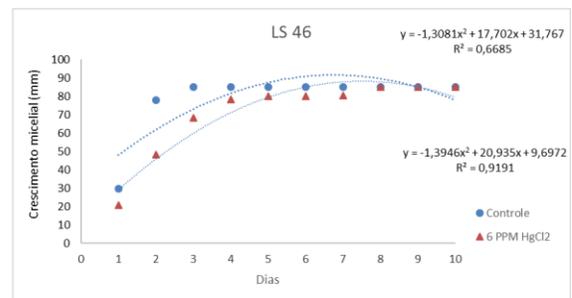
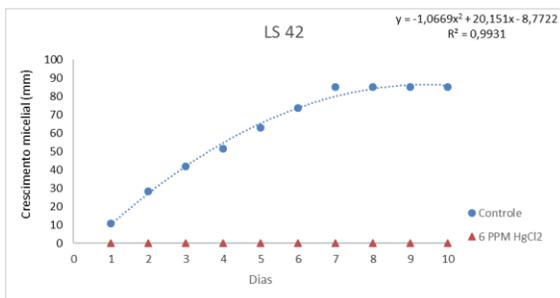
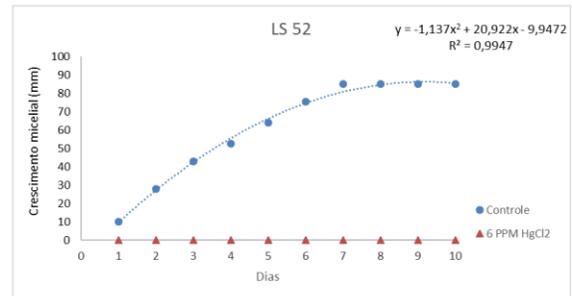
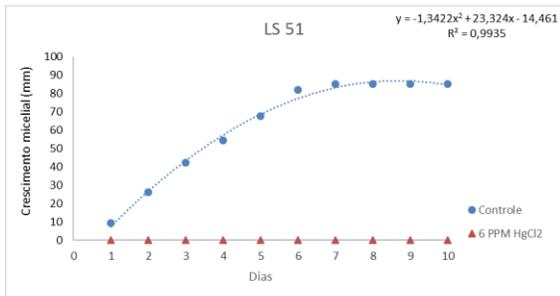
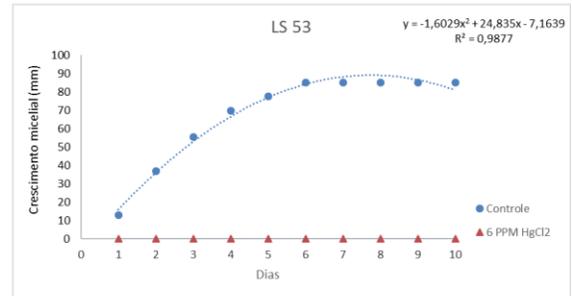
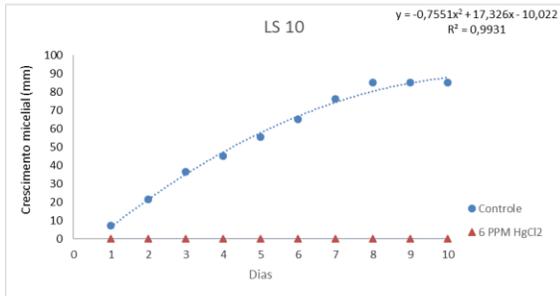
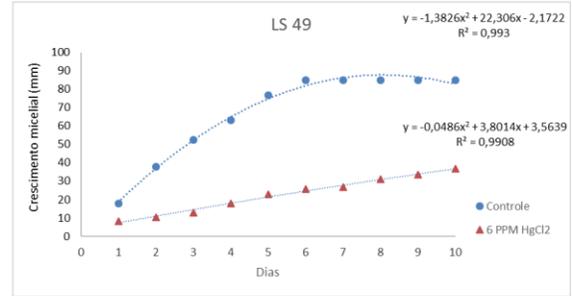
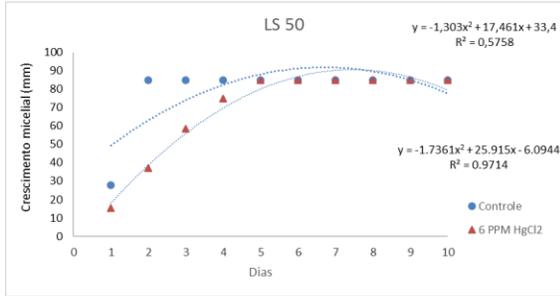
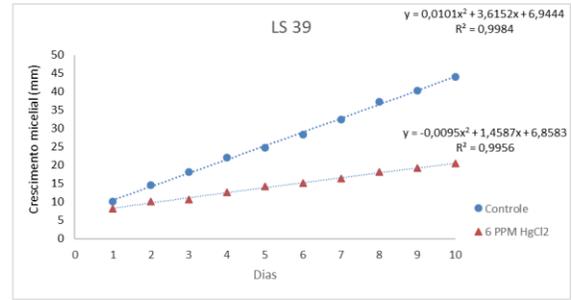
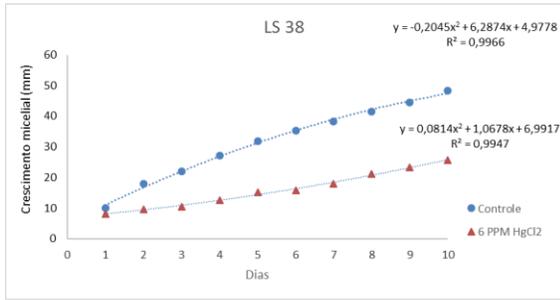
ID	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	IVCM
LS38	CT	1	9,5	15,5	21	24	27	30	33	35	39,5	44,5	3,5
LS38	CT	2	10,5	18	22,5	28	32,5	35,5	37,5	40,5	42,5	46	3,55
LS38	CT	3	10	20	22,5	29,5	36	40,5	44,5	49	51,5	54,5	4,45
		MEDIA	10	17,83333	22	27,16667	31,83333	35,33333	38,33333	41,5	44,5	48,33333	3,833333
LS38	4	1	8,5	11	12,5	16	20	22	25	29	31	34	2,55
LS38	4	2	8,5	10	12	15	18	20	22	24,5	27	30	2,15
LS38	4	3	7	8,5	9	11	14	14	16	19	21	24	1,7
		MEDIA	8	9,833333	11,16667	14	17,33333	18,66667	21	24,16667	26,33333	29,33333	2,133333
LS39	CT	1	10,5	15,5	19	22,5	25,5	28,5	33	37,5	41	45	3,45
LS39	CT	2	10	14	18	22,5	25	29,5	33,5	39	43	47	3,7
LS39	CT	3	10	14	17,5	21,5	24	27	31	35	37	40	3
		MEDIA	10,16667	14,5	18,16667	22,16667	24,83333	28,33333	32,5	37,16667	40,33333	44	3,833333
LS39	4	1	9,5	11	12	13,5	16	17,5	19	21,5	24,5	27,5	1,8
LS39	4	2	9	10	11	12,5	15,5	16,5	19	22,5	24,5	27,5	1,85
LS39	4	3	10	11,5	12	14	16	17	18,5	20,5	23	26	1,6
		MEDIA	9,5	10,83333	11,66667	13,33333	15,83333	17	18,83333	21,5	24	27	1,75
LS50	CT	1	26	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,9
LS50	CT	2	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
LS50	CT	3	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
		MEDIA	27,66667	85	5,733333								
LS50	4	1	20	43,5	67,5	85	85	85	85	85	85	85	6,5
LS50	4	2	20	53,5	75	85	85	85	85	85	85	85	6,5
LS50	4	3	13	41	67,5	85	85	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	17,66667	46	70	85	6,733333						
LS49	CT	1	16	36,5	51,5	63	75	85	85	85	85	85	6,9
LS49	CT	2	19,5	39	54,5	66	80	85	85	85	85	85	6,55
LS49	CT	3	18	38,5	51	60	75	85	85	85	85	85	6,7
		MEDIA	17,83333	38	52,33333	63	76,66667	85	85	85	85	85	6,716667
LS49	4	1	9,5	11,5	14	18	23	26,5	30,5	34	36,5	39,5	3
LS49	4	2	7	10	13	18	25	30	34	37	42	45	3,8
LS49	4	3	9,5	10,5	13	16,5	23	25,5	28,5	31,5	35,5	38,5	2,9
		MEDIA	8,666667	10,66667	13,33333	17,5	23,66667	27,33333	31	34,16667	38	41	3,233333
LS10	CT	1	8	22	36	45,5	55	65	75	85	85	85	7,7
LS10	CT	2	7	21	36	45	55	65	76,5	85	85	85	7,8
LS10	CT	3	7	22	37	45	56	65	77	85	85	85	7,8
		MEDIA	7,333333	21,66667	36,33333	45,16667	55,33333	65	76,16667	85	85	85	7,766667
LS10	4	1	0	15	29	38	50	61	75	85	85	85	8,5
LS10	4	2	0	8,5	19	28,5	41,5	53	68,5	85	85	85	8,5
LS10	4	3	0	14	25,5	35	47,5	59,5	74	85	85	85	8,5
		MEDIA	0	12,5	24,5	33,83333	46,33333	57,83333	72,5	85	85	85	8,5
LS53	CT	1	13	36	55	70	78	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	2	13	37,5	56	70	78,5	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	3	13	36,5	55	68,5	76,5	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	13	36,66667	55,33333	69,5	77,66667	85	85	85	85	85	7,2
LS53	4	1	10	40	62	75	85	85	85	85	85	85	7,5
LS53	4	2	8,5	23,5	41,5	45	50	54	57,5	65	72,5	77,5	6,9
LS53	4	3	8	18,5	39,5	52	63	70,5	75	77	85	85	7,7
		MEDIA	8,833333	27,33333	47,66667	57,33333	66	69,83333	72,5	75,66667	80,83333	82,5	7,366667
LS51	CT	1	10	27	43	55	69,5	85	85	85	85	85	7,5
LS51	CT	2	9	25,5	42	53	65	75,5	85	85	85	85	7,6
LS51	CT	3	9	26	42	55	68	85	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	9,333333	26,16667	42,33333	54,33333	67,5	81,83333	85	85	85	85	7,566667
LS51	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	4	3	0	0	0	0	10	20	32	42	43,5	45	4,5
		MEDIA	0	0	0	0	3,333333	6,666667	10,66667	14	14,5	15	1,5
LS52	CT	1	12	29,5	44	54	65,5	75	85	85	85	85	7,3
LS52	CT	2	10	28	43	52	64	75	85	85	85	85	7,5
LS52	CT	3	9	27	42	51,5	63	76	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	10,33333	28,16667	43	52,5	64,16667	75,33333	85	85	85	85	7,466667
LS52	4	1	7	17	25	30,5	35	40	44	48	52	56	4,9
LS52	4	2	9	27	37	43	49	54	62	69	72,5	77	6,8
LS52	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	5,333333	14,66667	20,66667	24,5	28	31,33333	35,33333	39	41,5	44,33333	3,9
LS42	CT	1	11	28,5	42,5	52,5	66	77	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	2	11	28,5	42	51	61,5	71,5	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	3	11	28	41,5	51,5	61,5	73	85	85	85	85	7,4
		MEDIA	11	28,33333	42	51,66667	63	73,83333	85	85	85	85	7,4
LS42	4	1	0	12	26	36	45,5	55	73	76	78,5	81,5	8,15
LS42	4	2	0	20,5	32,5	43	51,5	60	69,5	78,5	80	83	8,3
LS42	4	3	0	20	33,5	42	48	53	60	70	75	78	7,8
		MEDIA	0	17,5	30,66667	40,33333	48,33333	56	67,5	74,83333	77,83333	80,83333	8,083333
LS46	CT	1	31	80	85	85	85	85	85	85	85	85	5,4
LS46	CT	2	29,5	78,5	85	85	85	85	85	85	85	85	5,55
LS46	CT	3	29	75	85	85	85	85	85	85	85	85	5,6
		MEDIA	29,83333	77,83333	85	5,516667							
LS46	4	1	25	55	75	85	85	85	85	85	85	85	6
LS46	4	2	24	55,5	75	85	85	85	85	85	85	85	6,1
LS46	4	3	29,5	72,5	72,5	85	85	85	85	85	85	85	5,55
		MEDIA	26,16667	61	74,16667	85	5,883333						



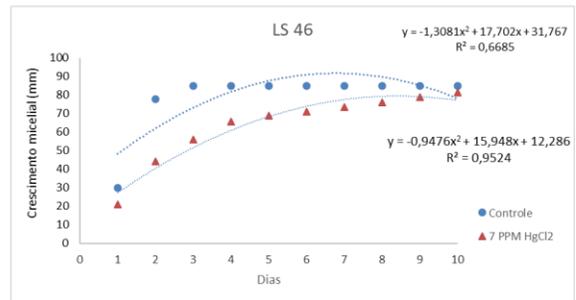
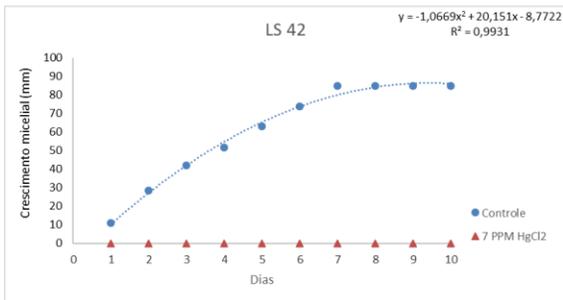
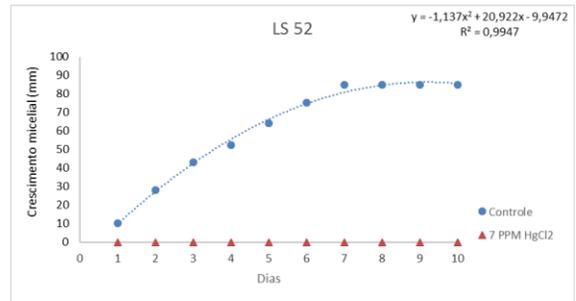
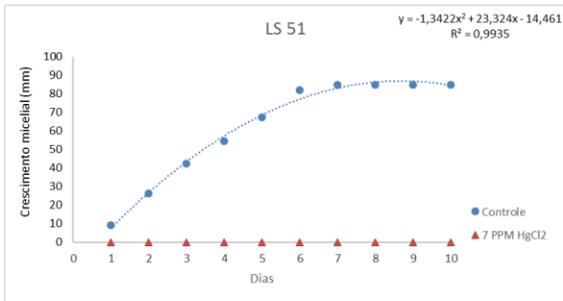
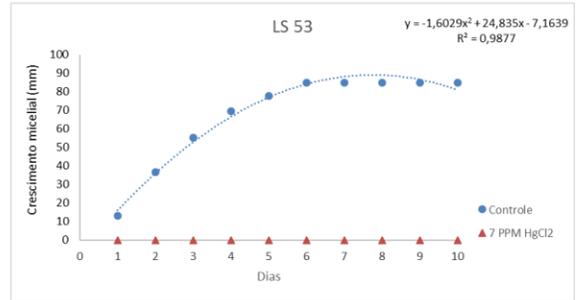
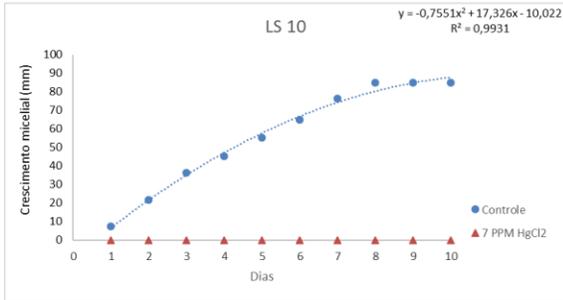
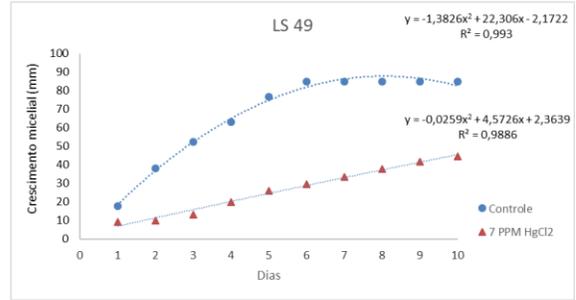
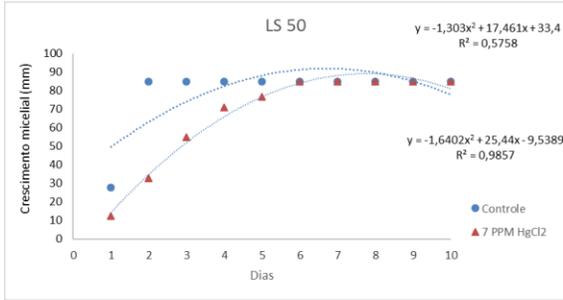
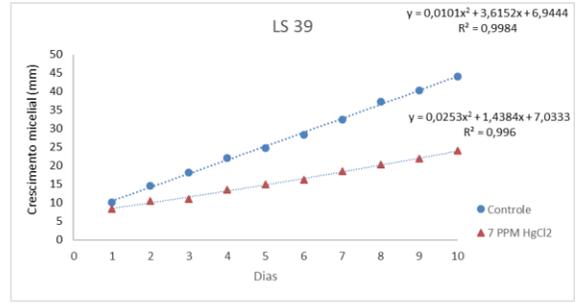
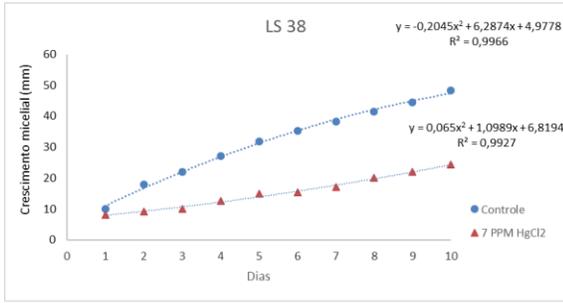
ID	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	IVCM
LS38	CT	1	9,5	15,5	21	24	27	30	33	35	39,5	44,5	3,5
LS38	CT	2	10,5	18	22,5	28	32,5	35,5	37,5	40,5	42,5	46	3,55
LS38	CT	3	10	20	22,5	29,5	36	40,5	44,5	49	51,5	54,5	4,45
		MEDIA	10	17,83333	22	27,16667	31,83333	35,33333	38,33333	41,5	44,5	48,33333	3,833333
LS38	5	1	8	10	11	13	16	16	17,5	20,5	23,5	26,5	1,85
LS38	5	2	8	9	10	12	15	16	17,5	20,5	23,5	26,5	1,85
LS38	5	3	8,5	10	11	13	16	17	20	23	25	28	1,95
		MEDIA	8,166667	9,666667	10,66667	12,66667	15,66667	16,33333	18,33333	21,33333	24	27	1,883333
LS39	CT	1	10,5	15,5	19	22,5	25,5	28,5	33	37,5	41	45	3,45
LS39	CT	2	10	14	18	22,5	25	29,5	33,5	39	43	47	3,7
LS39	CT	3	10	14	17,5	21,5	24	27	31	35	37	40	3
		MEDIA	10,16667	14,5	18,16667	22,16667	24,83333	28,33333	32,5	37,16667	40,33333	44	3,383333
LS39	5	1	8,5	12,5	13,5	15,5	16	17	19,5	21,5	22,5	24	1,55
LS39	5	2	8,5	10,5	11,5	13	15	15	16,5	19	19,5	20,5	1,2
LS39	5	3	9	11	12	15	16	17,5	19	20,5	21,5	22	1,3
		MEDIA	8,666667	11,33333	12,33333	14,5	15,66667	16,5	18,33333	20,33333	21,16667	22,16667	1,35
LS50	CT	1	26	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,9
LS50	CT	2	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
LS50	CT	3	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
		MEDIA	27,66667	85	5,733333								
LS50	5	1	17,5	35	55	63,5	85	85	85	85	85	85	6,75
LS50	5	2	21	46	72,5	75,5	85	85	85	85	85	85	6,4
LS50	5	3	15,5	35,5	60	75	85	85	85	85	85	85	6,95
		MEDIA	18	38,83333	62,5	71,33333	85	85	85	85	85	85	6,7
LS49	CT	1	16	36,5	51,5	63	75	85	85	85	85	85	6,9
LS49	CT	2	19,5	39	54,5	66	80	85	85	85	85	85	6,55
LS49	CT	3	18	38,5	51	60	75	85	85	85	85	85	6,7
		MEDIA	17,83333	38	52,33333	63	76,66667	85	85	85	85	85	6,716667
LS49	5	1	9,5	11	18	25,5	34	40	47,5	55,5	63	72	6,25
LS49	5	2	8,5	10,5	15	23,5	31,5	38	45,5	54	60	72	6,35
LS49	5	3	9	10	15	23	31,5	37	41,5	47,5	51,5	57,5	4,85
		MEDIA	9	10,5	16	24	32,33333	38,33333	44,83333	52,33333	58,16667	67,16667	5,816667
LS10	CT	1	8	22	36	45,5	55	65	75	85	85	85	7,7
LS10	CT	2	7	21	36	45	55	65	76,5	85	85	85	7,8
LS10	CT	3	7	22	37	45	56	65	77	85	85	85	7,8
		MEDIA	7,333333	21,66667	36,33333	45,16667	55,33333	65	76,16667	85	85	85	7,766667
LS10	5	1	0	0	23	30,5	42	53	68	85	85	85	8,5
LS10	5	2	0	0	13	21	32	44,5	58	75	85	85	8,5
LS10	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0	0	12	17,16667	24,66667	32,5	42	53,33333	56,66667	56,66667	5,666667
LS53	CT	1	13	36	55	70	78	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	2	13	37,5	56	70	78,5	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	3	13	36,5	55	68,5	76,5	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	13	36,66667	55,33333	69,5	77,66667	85	85	85	85	85	7,2
LS53	5	1	7	31,5	49	60	70	75	77	85	85	85	7,8
LS53	5	2	0	22,5	41,5	53,5	65,5	73,5	80	85	85	85	8,5
LS53	5	3	7	31	50	62	72	75,5	80	85	85	85	7,8
		MEDIA	4,666667	28,33333	46,83333	58,5	69,16667	74,66667	79	85	85	85	8,033333
LS51	CT	1	10	27	43	55	69,5	85	85	85	85	85	7,5
LS51	CT	2	9	25,5	42	53	65	75,5	85	85	85	85	7,6
LS51	CT	3	9	26	42	55	68	85	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	9,333333	26,16667	42,33333	54,33333	67,5	81,83333	85	85	85	85	7,566667
LS51	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0										
LS52	CT	1	12	29,5	44	54	65,5	75	85	85	85	85	7,3
LS52	CT	2	10	28	43	52	64	75	85	85	85	85	7,5
LS52	CT	3	9	27	42	51,5	63	76	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	10,33333	28,16667	43	52,5	64,16667	75,33333	85	85	85	85	7,466667
LS52	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS52	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS52	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0										
LS42	CT	1	11	28,5	42,5	52,5	66	77	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	2	11	28,5	42	51	61,5	71,5	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	3	11	28	41,5	51,5	61,5	73	85	85	85	85	7,4
		MEDIA	11	28,33333	42	51,66667	63	73,83333	85	85	85	85	7,4
LS42	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS42	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS42	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0										
LS46	CT	1	31	80	85	85	85	85	85	85	85	85	5,4
LS46	CT	2	29,5	78,5	85	85	85	85	85	85	85	85	5,55
LS46	CT	3	29	75	85	85	85	85	85	85	85	85	5,6
		MEDIA	29,83333	77,83333	85	5,516667							
LS46	5	1	21	48,5	63,5	71	85	85	85	85	85	85	6,4
LS46	5	2	20	47	70,5	85	85	85	85	85	85	85	6,5
LS46	5	3	21	48	65	72	75	75	85	85	85	85	6,4
		MEDIA	20,66667	47,83333	66,33333	76	81,66667	81,66667	85	85	85	85	6,433333



ID	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	IVCM
LS38	CT	1	9,5	15,5	21	24	27	30	33	35	39,5	44,5	3,5
LS38	CT	2	10,5	18	22,5	28	32,5	35,5	37,5	40,5	42,5	46	3,55
LS38	CT	3	10	20	22	29,5	36	40,5	44,5	49	51,5	54,5	4,45
		MEDIA	10,1783333	17,833333	22	27,166667	31,833333	35,333333	38,333333	41,5	44,5	48,333333	3,8333333
LS38	6	1	8,5	10	10,5	13	15,5	16,5	19	22,5	24,5	26,5	1,8
LS38	6	2	7,5	9	10	12,5	15	15,5	17,5	21	23,5	26	1,85
LS38	6	3	8,5	10	10,5	12,5	15	15,5	17,5	20	22	24,5	1,6
		MEDIA	8,1666667	9,6666667	10,333333	12,666667	15,166667	15,833333	18	21,166667	23,333333	25,666667	1,75
LS39	CT	1	10,5	15,5	19	22,5	25,5	28,5	33	37,5	41	45	3,45
LS39	CT	2	10	14	18	22,5	25	29,5	33,5	39	43	47	3,7
LS39	CT	3	10	14	17,5	21,5	24	27	31	35	37	40	3
		MEDIA	10,166667	14,5	18,166667	22,166667	24,833333	28,333333	32,5	37,166667	40,333333	44	3,8333333
LS39	6	1	8,5	10,5	11	13	15	16	17	19	20,5	22	1,35
LS39	6	2	8	10	10	12	13	14	15	17	17,5	18,5	1,05
LS39	6	3	8	10	11	13	14,5	15,5	17	18,5	19,5	21	1,3
		MEDIA	8,1666667	10,166667	10,666667	12,666667	14,166667	15,166667	16,333333	18,166667	19,166667	20,5	1,2333333
LS50	CT	1	26	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,9
LS50	CT	2	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
LS50	CT	3	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
		MEDIA	27,666667	85	5,7333333								
LS50	6	1	14	34	56	75	85	85	85	85	85	85	7,1
LS50	6	2	15,5	37,5	60	75	85	85	85	85	85	85	6,95
LS50	6	3	16	40	60	75	85	85	85	85	85	85	6,9
		MEDIA	15,166667	37,166667	58,666667	75	85	85	85	85	85	85	6,9833333
LS49	CT	1	16	36,5	51,5	63	75	85	85	85	85	85	6,9
LS49	CT	2	19,5	39	54,5	66	80	85	85	85	85	85	6,55
LS49	CT	3	18	38,5	51	60	75	85	85	85	85	85	6,7
		MEDIA	17,833333	38	52,333333	63	76,666667	85	85	85	85	85	6,7166667
LS49	6	1	8	10,5	13,5	18	22,5	25	28	30	33	35,5	2,75
LS49	6	2	8,5	10	11,5	16	20,5	23	25,5	28	28	32,5	2,4
LS49	6	3	8,5	10,5	14	19	25,5	29	27	35	39,5	42,5	3,4
		MEDIA	8,3333333	10,333333	13	17,666667	22,833333	25,666667	26,833333	31	33,5	36,833333	2,85
LS10	CT	1	8	22	36	45,5	55	65	75	85	85	85	7,7
LS10	CT	2	7	21	36	45	55	65	76,5	85	85	85	7,8
LS10	CT	3	7	22	37	45	56	65	77	85	85	85	7,8
		MEDIA	7,3333333	21,666667	36,333333	45,166667	55,333333	65	76,166667	85	85	85	7,7666667
LS10	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS10	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS10	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS53	CT	1	13	36	55	70	78	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	2	13	37,5	56	70	78,5	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	3	13	36,5	55	68,5	76,5	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	13	36,666667	55,333333	69,5	77,666667	85	85	85	85	85	7,2
LS53	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS53	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS53	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	CT	1	10	27	43	55	69,5	85	85	85	85	85	7,5
LS51	CT	2	9	25,5	42	53	65	75,5	85	85	85	85	7,6
LS51	CT	3	9	26	42	55	68	85	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	9,3333333	26,166667	42,333333	54,333333	67,5	81,833333	85	85	85	85	7,5666667
LS51	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS52	CT	1	12	29,5	44	54	65,5	75	85	85	85	85	7,3
LS52	CT	2	10	28	43	52	64	75	85	85	85	85	7,5
LS52	CT	3	9	27	42	51,5	63	76	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	10,333333	28,166667	43	52,5	64,166667	75,333333	85	85	85	85	7,4666667
LS52	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS52	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS52	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS42	CT	1	11	28,5	42,5	52,5	66	77	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	2	11	28,5	42	51	61,5	71,5	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	3	11	28	41,5	51,5	61,5	73	85	85	85	85	7,4
		MEDIA	11	28,333333	42	51,666667	63	73,833333	85	85	85	85	7,4
LS42	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS42	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS42	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS46	CT	1	31	80	85	85	85	85	85	85	85	85	5,4
LS46	CT	2	29,5	78,5	85	85	85	85	85	85	85	85	5,55
LS46	CT	3	29	75	85	85	85	85	85	85	85	85	5,6
		MEDIA	29,833333	77,833333	85	5,5166667							
LS46	6	1	21	50,5	75	85	85	85	85	85	85	85	6,4
LS46	6	2	19,5	46	70	85	85	85	85	85	85	85	6,55
LS46	6	3	22	49	59,5	65,5	70	70	71,5	85	85	85	6,3
		MEDIA	20,833333	48,5	68,166667	78,5	80	80	80,5	85	85	85	6,4166667



ID	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	IVCM
LS38	CT	1	9,5	15,5	21	24	27	30	33	35	39,5	44,5	3,5
LS38	CT	2	10,5	18	22,5	28	32,5	35,5	37,5	40,5	42,5	46	3,55
LS38	CT	3	10	20	22,5	29,5	36	40,5	44,5	49	51,5	54,5	4,45
		MEDIA	10	17,83333	22	27,16667	31,83333	35,33333	38,33333	41,5	44,5	48,33333	3,833333
LS38	7	1	8,5	10	10	12,5	14,5	15	17	20	21,5	24	1,55
LS38	7	2	8	9	10	12,5	15	16	17,5	20	22,5	24,5	1,65
LS38	7	3	8	8,5	10	13	15	15	17	20	22	24,5	1,65
		MEDIA	8,166667	9,166667	10	12,66667	14,83333	15,33333	17,16667	20	22	24,33333	1,616667
LS39	CT	1	10,5	15,5	19	22,5	25,5	28,5	33	37,5	41	45	3,45
LS39	CT	2	10	14	18	22,5	25	29,5	33,5	39	43	47	3,7
LS39	CT	3	10	14	17,5	21,5	24	27	31	35	37	40	3
		MEDIA	10,16667	14,5	18,16667	22,16667	24,83333	28,33333	32,5	37,16667	40,33333	44	3,383333
LS39	7	1	8	10,5	11	13	15,5	16,5	20	22	23,5	25,5	1,75
LS39	7	2	8,5	10,5	11	13,5	14,5	16	18,5	20	22	24,5	1,6
LS39	7	3	8,5	10,5	11	14	15	16	17	19	20	22	1,35
		MEDIA	8,333333	10,5	11	13,5	15	16,16667	18,5	20,33333	21,83333	24	1,566667
LS50	CT	1	26	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,9
LS50	CT	2	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
LS50	CT	3	28,5	85	85	85	85	85	85	85	85	85	5,65
		MEDIA	27,66667	85	5,733333								
LS50	7	1	13,5	34,5	56	71	76,5	85	85	85	85	85	7,15
LS50	7	2	11	30,5	56	72,5	77,5	85	85	85	85	85	7,4
LS50	7	3	13	33	52,5	69	75,5	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	12,5	32,66667	54,83333	70,83333	76,5	85	85	85	85	85	7,25
LS49	CT	1	16	36,5	51,5	63	75	85	85	85	85	85	6,9
LS49	CT	2	19,5	39	54,5	66	80	85	85	85	85	85	6,55
LS49	CT	3	18	38,5	51	60	75	85	85	85	85	85	6,7
		MEDIA	17,83333	38	52,33333	63	76,66667	85	85	85	85	85	6,716667
LS49	7	1	9,5	10,5	15	22	28,5	32,5	36,5	41	45	48	3,85
LS49	7	2	9	10	12	18	22	25	29	33	36	39	3
LS49	7	3	9	9,5	12,5	20	27	31	35	39,5	43,5	47	3,8
		MEDIA	9,166667	10	13,16667	20	25,83333	29,5	33,5	37,83333	41,5	44,66667	3,55
LS10	CT	1	8	22	36	45,5	55	65	75	85	85	85	7,7
LS10	CT	2	7	21	36	45	55	65	76,5	85	85	85	7,8
LS10	CT	3	7	22	37	45	56	65	77	85	85	85	7,8
		MEDIA	7,333333	21,66667	36,33333	45,16667	55,33333	65	76,16667	85	85	85	7,766667
LS10	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS10	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS10	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0										
LS53	CT	1	13	36	55	70	78	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	2	13	37,5	56	70	78,5	85	85	85	85	85	7,2
LS53	CT	3	13	36,5	55	68,5	76,5	85	85	85	85	85	7,2
		MEDIA	13	36,66667	55,33333	69,5	77,66667	85	85	85	85	85	7,2
LS53	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS53	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS53	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0										
LS51	CT	1	10	27	43	55	69,5	85	85	85	85	85	7,5
LS51	CT	2	9	25,5	42	53	65	75,5	85	85	85	85	7,6
LS51	CT	3	9	26	42	55	68	85	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	9,333333	26,16667	42,33333	54,33333	67,5	81,83333	85	85	85	85	7,566667
LS51	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS51	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0										
LS52	CT	1	12	29,5	44	54	65,5	75	85	85	85	85	7,3
LS52	CT	2	10	28	43	52	64	75	85	85	85	85	7,5
LS52	CT	3	9	27	42	51,5	63	76	85	85	85	85	7,6
		MEDIA	10,33333	28,16667	43	52,5	64,16667	75,33333	85	85	85	85	7,466667
LS52	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS52	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS52	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0										
LS42	CT	1	11	28,5	42,5	52,5	66	77	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	2	11	28,5	42	51	61,5	71,5	85	85	85	85	7,4
LS42	CT	3	11	28	41,5	51,5	61,5	73	85	85	85	85	7,4
		MEDIA	11	28,33333	42	51,66667	63	73,83333	85	85	85	85	7,4
LS42	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS42	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LS42	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEDIA	0										
LS46	CT	1	31	80	85	85	85	85	85	85	85	85	5,4
LS46	CT	2	29,5	78,5	85	85	85	85	85	85	85	85	5,55
LS46	CT	3	29	75	85	85	85	85	85	85	85	85	5,6
		MEDIA	29,83333	77,83333	85	5,516667							
LS46	7	1	20	40	57	71,5	76,5	78	80	85	85	85	6,5
LS46	7	2	22	46	55	63	65	67	70	73	77,5	81	5,9
LS46	7	3	20,5	46	55,5	62,5	65	67,5	70	73,5	77,5	81	5,7
		MEDIA	20,83333	44	55,83333	65,66667	68,83333	70,83333	73,33333	76	78,66667	81,16667	6,033333



ANEXO 2

Resultados preliminares das avaliações de diversidade de espécies nas oito plantas amostradas às margens do Igarapé do Sabino, São Luis, MA, Brasil..

Artigo em fase de elaboração.

SILVA, L.S. et al. Diversity of endophytic fungi in plants of a riparian area of Northeast Brazil. 2017.

Table 1. Plants sampled in a riparian área of the Igarapé do Sabino, São Luís, Maranhão, Brazil. CR = fungal colonization rate, “*”= not identified, “**”= plant identified at Family level.

Identification	Family	CR
<i>Abarema jupunba</i> (Willd.) Britton & Killip	Fabaceae	100%
<i>Agonandra brasiliensis</i> Miers ex Benth. & Hook.f.	Opiliaceae	100%
<i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.	Arecaceae	100%
<i>Eriotheca globosa</i> (Aubl.) A.Robyns	Malvaceae	100%
<i>Lecythis lurida</i> (Miers) S.A.Mori	Lecythidaceae	100%
Não identificada *	-	15%
Chrysobalanaceae **	Chrysobalanaceae	100%
Myrtaceae **	Myrtaceae	100%

Table 2. Frequency of endophytic fungi of plants collected on a riparian area in São Luís, MA, Brasil. Legendas: P1= *L. lurida*, P2= Não identificada 2, P3= Chrysobalanaceae, P4= Myrtaceae, P5=*A. brasiliensis*, P6= *A. jupunba*, P7= *E. globosa*, P8= *A. vulgare*, F.A.= frequência absoluta e F.R.= frequência relativa.

Fungo Endofítico	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	F.A.	F.R.(%)
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0.37
<i>Aspergillus japonicus</i>	0	0	0	0	8	0	0	2	10	1.25
<i>Aspergillus tamarii</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	4	0	0	0	0	0	0	4	0.5
<i>Aspergillus niger</i>	0	5	0	0	0	0	0	1	6	0.75
<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	8	9	0	0	0	0	17	2.12
<i>Botrytis</i> sp.	0	0	0	11	0	0	0	0	11	1.37
<i>Chaetomium globosum</i>	10	5	10	13	5	42	0	0	85	10.62
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0.37
<i>Colletotrichum</i> sp1	0	2	0	10	0	0	0	0	12	1.5
<i>Colletotrichum</i> sp2	0	0	0	17	0	0	0	0	17	2.12
<i>Macrophomina</i> sp1	40	0	14	22	0	0	0	0	76	9.5
<i>Macrophomina</i> sp2	0	0	0	7	0	0	0	0	7	0.8
<i>Macrophomina</i> sp3	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0.37
Morfotipo 1	52	0	11	27	0	0	0	0	90	11.25
Morfotipo 2	0	0	0	0	2	0	14	8	24	3
Morfotipo 3	0	0	0	0	90	0	0	0	90	11.25
Morfotipo 4	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0.5
Morfotipo 5	0	0	0	0	0	0	10	0	10	1.25
<i>Nigrospora</i> sp.	22	0	35	27	0	0	0	0	84	10.5
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	80	0	60	55	0	51	32	100	378	47.25
<i>Pestalotiopsis</i> sp1	48	0	40	0	0	0	0	0	88	11
<i>Pestalotiopsis</i> sp2	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0.75
<i>Recurvomyces</i> sp.	0	0	0	19	0	0	0	0	19	2.37
<i>Scytalidium</i> sp.	37	0	0	11	0	0	0	0	48	6
<i>Scytalidium lignicola</i>	0	0	0	0	0	5	0	25	30	3.75
<i>Septoria</i> sp.	0	0	0	15	0	0	0	0	15	1.87
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	0	0	0	3	23	0	26	3.25

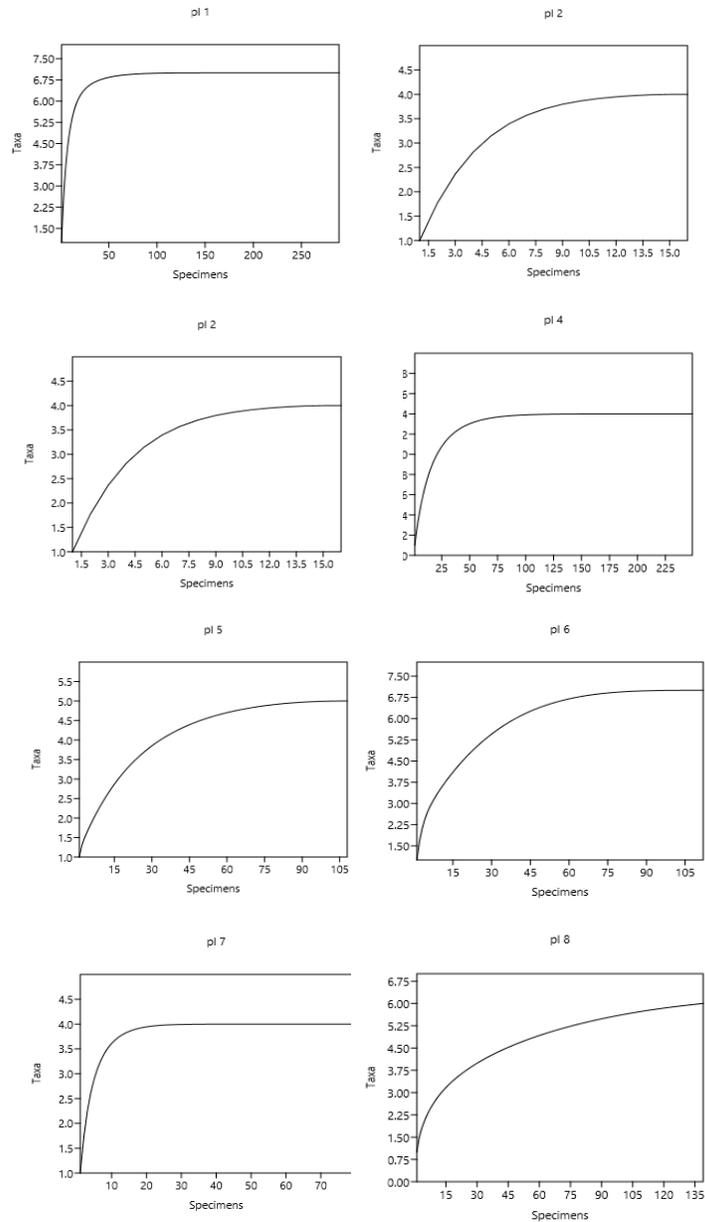


Fig. 1. Rarefaction curves of endophytic fungi (number of isolates=specimens vs. expected number of species=taxa) obtained from randomly sampled whole leaf segments of eight riparian plant species. Pl 1= *Abarema jupunba* (Willd.) Britton & Killip, pl 2= *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook.f., pl 3= *Astrocaryum vulgare* Mart., pl 4=*Eriotheca globosa* (Aubl.) A.Robyns, pl 5= *Lecythis lurida* (Miers) S.A.Mori, pl 6= Not identified *, pl 7= *Chrysobalanaceae* **, pl 8= *Myrtaceae* **; “*”= Not identified specie, “**”= plant identified at Family level.

Table 3. Species richness and diversity index of endophytic fungi associated with the leaves of eight riparian plant species. Pl 1= *Abarema jupunba* (Willd.) Britton & Killip, pl 2= *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook.f., pl 3= *Astrocaryum vulgare* Mart., pl 4=*Eriotheca globosa* (Aubl.) A.Robyns, pl 5= *Lecythis lurida* (Miers) S.A.Mori, pl 6= Not identified *, pl 7= *Chrysobalanaceae* **, pl 8= *Myrtaceae* **

“*”= Not identified specie, “**”= plant identified at Family level.

	<i>pl 1</i>	<i>pl 2</i>	<i>pl 3</i>	<i>pl 4</i>	<i>pl 5</i>	<i>pl 6</i>	<i>pl 7</i>	<i>pl 8</i>
<i>Species</i>	7	3	7	14	5	7	4	5
<i>richness_S</i>								
<i>Individuals</i>	289	12	186	249	108	112	79	136
<i>Dominance_D</i>	0,1791	0,375	0,2079	0,1051	0,7032	0,354	0,2963	0,5782
<i>Simpson_1-D</i>	0,8209	0,625	0,7921	0,8949	0,2968	0,646	0,7037	0,4218
<i>Shannon_H</i>	1,812	1,028	1,722	2,448	0,6604	1,297	1,294	0,8023
<i>Evenness_e^H/S</i>	0,8744	0,932	0,7994	0,8258	0,3871	0,5225	0,9115	0,4461
<i>Brillouin</i>	1,759	0,8099	1,649	2,335	0,6009	1,204	1,213	0,7534
<i>Menhinick</i>	0,4118	0,866	0,5133	0,8872	0,4811	0,6614	0,45	0,4287
<i>Margalef</i>	1,059	0,8049	1,148	2,356	0,8543	1,272	0,6866	0,8142
<i>Equitability_J</i>	0,931	0,9359	0,8849	0,9275	0,4103	0,6664	0,9331	0,4985

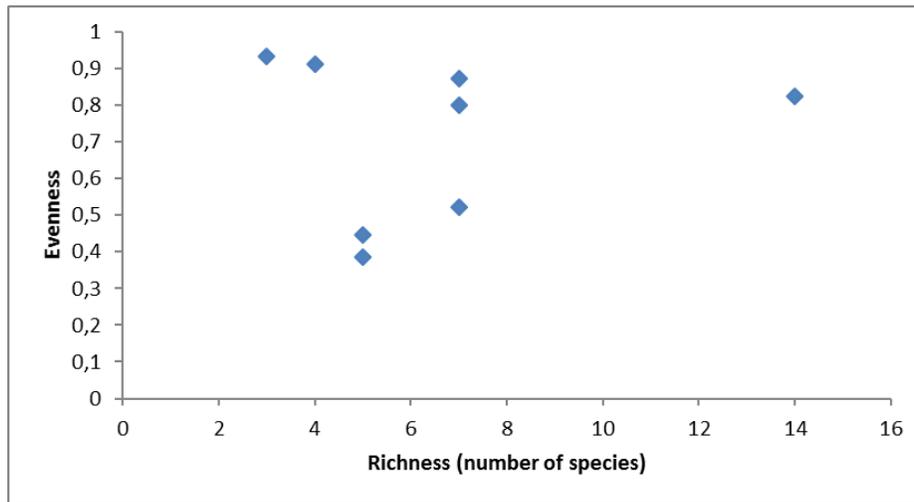


Fig 2. Evenness vs richness plot of the endophytic fungi of eight riparian plant species.

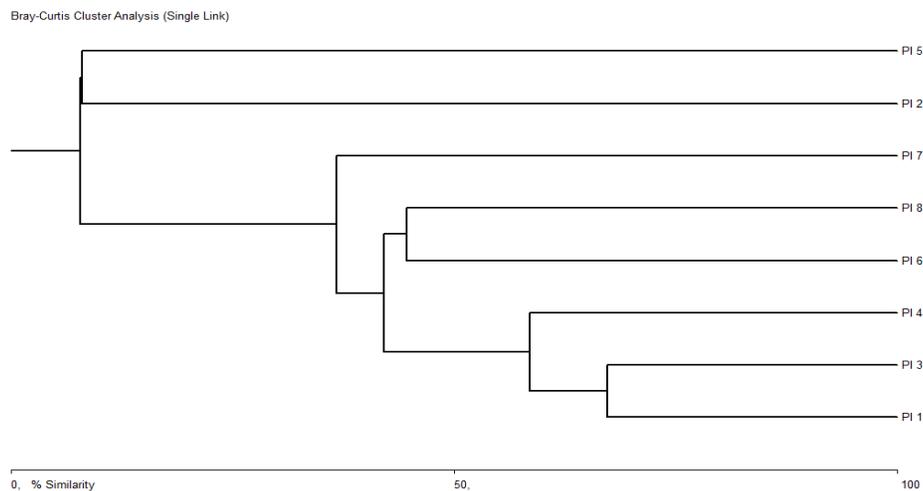


Fig 3. Bray-Curtis Cluster Analysis of fungal endophyte community of eight riparian plants in São Luis, MA, Brazil. PI 1= *Abarema jupunba* (Willd.) Britton & Killip, pl 2= *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook.f., pl 3= *Astrocaryum vulgare* Mart., pl 4=*Eriotheca globosa* (Aubl.) A.Robyns, pl 5= *Lecythis lurida* (Miers) S.A.Mori, pl 6= Not identified *, pl 7= *Chrysobalanaceae* **, pl 8= *Myrtaceae* **

“*”= Not identified specie, “**”= plant identified at Family level.

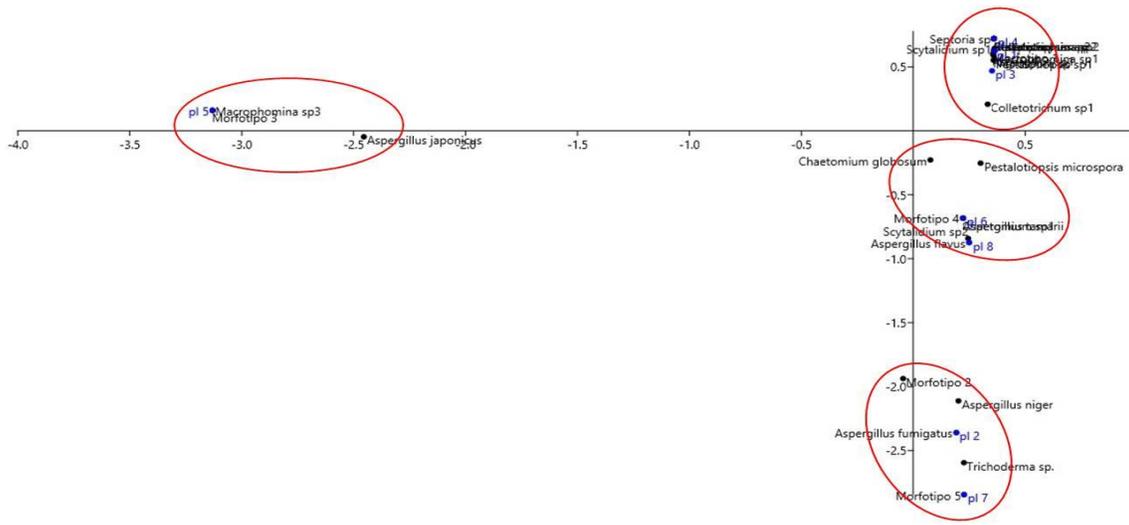


Fig 4. Correspondence Analysis of fungal endophyte community of eight riparian plants in São Luis, MA, Brazil. Pl 1= *Abarema jupunba* (Willd.) Britton & Killip, pl 2= *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook.f., pl 3= *Astrocaryum vulgare* Mart., pl 4=*Eriotheca globosa* (Aubl.) A.Robyns, pl 5= *Lecythis lurida* (Miers) S.A.Mori, pl 6= Not identified *, pl 7= *Chrysobalanaceae* **, pl 8= *Myrtaceae* **
 “*”= Not identified specie, “**”= plant identified at Family level.

Table 4. Eigenvalue of the correspondence analysis of fungal endophyte community of eight riparian plants in São Luis,

Axis	Eigenvalue	% of total	Cumulative
1	0,918327	30,924	30,924
2	0,553923	18,653	49,576
3	0,548876	18,483	68,059
4	0,344184	11,59	79,649
5	0,288415	9,712	89,361
6	0,22105	7,4436	96,805
7	0,094891	3,1953	100