

## Notas Científicas

### Ocorrência de fungos endofíticos "dark septate" em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia

Gilmara Maria Duarte Pereira<sup>(1)</sup>, Karen Gonçalves Ribeiro<sup>(1)</sup>, Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>(2)</sup>, Marcos José Salgado Vital<sup>(1)</sup>, Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>(3)</sup> e Jerri Édson Zilli<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Roraima, Campus Paricarana, Avenida Capitão Enê Garcez, s/nº, Bairro Aeroporto, CEP 69304-000 Boa Vista, RR. E-mail: gmdpereira@hotmail.com, karenkgr@gmail.com, marcos.vital@pq.cnpq.br <sup>(2)</sup>Embrapa Semiárido, BR 428, Km 152 Zona Rural, CEP 56302-970 Petrolina, PE. E-mail: paulo.ivan@cpatsa.embrapa.br <sup>(3)</sup>Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Avenida P. H. Rolfs, s/nº, CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: mkasuya@ufv.br <sup>(4)</sup>Embrapa Roraima, BR 174, Km 08, Distrito Industrial, Caixa Postal 133, CEP 69307-970 Boa Vista, RR. E-mail: zilli@cpafrr.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de fungos endofíticos "dark septate" (DSEF) em *Oryza glumaepatula*, na Amazônia, e sua capacidade de colonização in vitro. Foram coletadas plantas de *O. glumaepatula* em área de cerrado e de mata em Roraima. As raízes foram tratadas para a observação de hifas melanizadas septadas e de microescleródios. Os fungos foram isolados em meio ágar malte. Os DSEF foram observados em plantas coletadas em ambos os ambientes, com maior colonização nas coletadas da mata. Um isolado foi capaz de colonizar o hospedeiro original e também plantas de *Oryza sativa*, exibindo as estruturas características de DSEF em plantas de arroz saudáveis.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, arroz silvestre, micossimbionte.

#### Occurrence of dark septate endophyte fungi in *Oryza glumaepatula* roots in Amazonia

Abstract – The objective of this work was to assess the occurrence of dark septate endophyte fungi (DSEF) in *Oryza glumaepatula* in Amazonia, and its in vitro colonization capacity. *Oryza glumaepatula* plants were collected in forest and cerrado areas of the Roraima state, Brazil. The roots were prepared to observe septate melanized hyphae and microesclerotia. The isolation of fungi was done in agar malte medium. Dark septate endophyte fungi were observed in plants from both environments, with higher colonization on those collected in the forest. One isolate was able to colonize the original host and also *Oryza sativa* plants, exhibiting typical DSEF structures in rice healthy plants.

Index terms: *Oryza sativa*, wild rice, mycossymbiont.

*Oryza glumaepatula* Steud. é uma espécie de arroz silvestre que ocorre no Pantanal Mato-grossense, no Planalto Central e em áreas de várzea da Amazônia (Rangel et al., 2006). A abundante produção de biomassa de plantas saudáveis em ambientes oligotróficos, em várzeas da Amazônia, indica que essa espécie é capaz de estabelecer associações mutualistas com microrganismos que auxiliam o seu estabelecimento e desenvolvimento.

Recentemente, a associação entre espécies de arroz silvestre com bactérias diazotróficas (Zhang et al., 2008) e fungos endofíticos "dark septate" (DSEF) (Yuan et al., 2010) foi relatada. Alguns autores têm sugerido que os DSEF são capazes

de estabelecer associações mutualistas com seus hospedeiros, pois atuam como promotores do crescimento vegetal e, principalmente, facilitam a absorção de fósforo e nitrogênio (Chen et al., 2010). Também tem sido observado que os DSEF podem coexistir com fungos micorrízicos e produzir metabólitos capazes de aumentar a germinação, o crescimento e a ramificação de hifas desses fungos, beneficiando a planta hospedeira de forma indireta (Scervino et al., 2009). Porém, diferentemente de fungos micorrízicos arbusculares, os DSEF não são biotróficos obrigatórios, o que facilita seu cultivo em meio de cultura e o desenvolvimento de inoculantes que visem à promoção do crescimento vegetal.

No Brasil, estudos recentes mostram que diversas espécies arbóreas e herbáceas, em área de cerrado em Minas Gerais (Detmann et al., 2008), e espécies aquáticas, coletadas em diferentes pontos da Bacia do Rio Paraná (Marins et al., 2009), são colonizadas por DSEF. Na Amazônia, não se tem conhecimento de estudos que avaliam a ocorrência de DSEF em associação com espécies vegetais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de DSEF em *O. glumaepatula*, coletadas em áreas de mata e cerrado do Estado de Roraima, bem como avaliar a colonização de *O. sativa* por isolados de DSEF em condições gnotobióticas.

Foram realizadas duas coletas de plantas de *O. glumaepatula*, entre os meses de setembro de 2009 e março de 2010: a primeira em uma área de cerrado, no Município de Bonfim, RR (02°58'N, 60°21'W); e a segunda, nas proximidades de uma área de mata próxima ao Parque Nacional do Viruá, Caracarái, RR (01°24'N, W 60°59'W). No cerrado, foram coletadas plantas em estágio reprodutivo, em locais alagados e secos. Em cada um dos locais, foram coletadas três touceiras, em três pontos distintos, resultando num total de seis amostras compostas. Em área de mata, foram coletadas plantas de arroz jovens e em fase reprodutiva, em três pontos distintos, também com três touceiras, resultando num total de seis amostras compostas. As plantas foram acondicionadas em sacos de plástico e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia do Solo, da Embrapa Roraima, Boa Vista, RR.

Para a observação das estruturas típicas de DSEF, o sistema radicular das plantas foi seccionado em fragmentos de aproximadamente 1 cm, que foram fixados em formol, ácido acético e álcool etílico (FAA), na proporção 1:1:5, v v<sup>-1</sup>. Posteriormente, as raízes foram diafanizadas, neutralizadas e coradas com azul de tripano em lactoglicerol, conforme Brundrett et al. (1996), com adaptações de exposição das raízes ao KOH à temperatura ambiente. A presença de microescleródios e hifas melanizadas septadas foi observada sob microscópio óptico, Leica 2500DM, e registradas utilizando-se câmera Leica DFC 295 (Leica, Oberkochen, Alemanha).

A determinação da percentagem de colonização de raízes por DSEF, nas áreas de mata e de cerrado, foi realizada pelo método da contagem em lâmina quadriculada (Giovannetti & Mosse, 1980), em que 40 segmentos de raízes por planta, de aproximadamente

1 cm, foram selecionados ao acaso e montados paralelamente em uma lâmina de microscópio, com três repetições. Os dados de percentagem de colonização foram transformados para ln(y) e as médias comparadas pelo teste t de Bonferroni a 10% de probabilidade.

Para o isolamento dos DSEF, as raízes não fixadas foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% e peróxido de hidrogênio a 33%, por 2 e 1 min, respectivamente (Ahlich & Sieber, 1996). Em seguida, as raízes foram seccionadas em fragmentos de 1 cm e colocadas em placas com meio de cultura ágar malte (extrato de malte 20 g L<sup>-1</sup> e ágar 15 g L<sup>-1</sup>), adicionado de cloranfenicol (100 mg L<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas em estufa a 28°C, no escuro, e o aparecimento das colônias fúngicas melanizadas foi monitorado diariamente, durante duas semanas. Os isolados obtidos foram depositados na Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Roraima.

Posteriormente, realizou-se um experimento em vasos, para avaliar a capacidade dos isolados fúngicos, obtidos de *O. glumaepatula*, colonizarem raízes do hospedeiro original, e a produção das estruturas características de DSEF. As sementes de arroz foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio, pré-germinaram em ágar-água e, posteriormente, foram transferidas para vasos com meio Hoagland ½ força (Hoagland & Arnon, 1950), com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Seis plântulas de arroz foram transplantadas para cada vaso e submetidas à infestação por meio de discos de ágar malte com 3 mm de diâmetro, que continham o isolado fúngico. Os vasos receberam 1 mL de água por semana e foram mantidos por seis semanas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas.

Conduziu-se, também, um ensaio para avaliar a capacidade de colonização por um dos isolados fúngicos em plantas de arroz comercial *O. sativa*, nas condições experimentais descritas para *O. glumaepatula*.

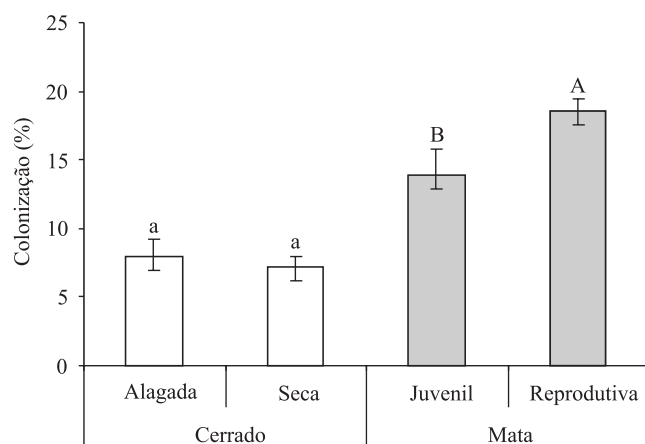
Houve diferença significativa na percentagem de colonização por DSEF entre as plantas de *O. glumaepatula* coletadas em área de mata e as de cerrado. A média de colonização por DSEF foi de 16 e 7,7%, em plantas das áreas de mata e de cerrado, respectivamente. Esta diferença na colonização de plantas por DSEF, entre os dois ambientes estudados, era esperada, uma vez que o solo da área de mata apresenta maior teor de matéria orgânica e de nutrientes em comparação ao do cerrado. Na área de cerrado, a percentagem de colonização de plantas por

DSEF foi igual nas áreas alagadas e seca, o que indica que esses fungos são capazes de colonizar as plantas de *O. glumaepatula* em condições de alagamento (Figura 1). Na área de mata, a colonização das plantas de arroz em estágio reprodutivo foi maior do que nas plantas em estágio juvenil, o que indica que a colonização de raízes de arroz silvestre por DSEF pode ser influenciada pelo estágio fisiológico das plantas (Lingfei et al., 2005). Há indícios de que a associação entre arroz silvestre e DSEF seja semelhante à associação micorrízica (Mandyam & Jumpponen, 2005), cuja percentagem de colonização é maior em plantas em estágio reprodutivo, em comparação a plantas mais jovens (Saif, 1977). É importante destacar que as áreas amostradas na mata compõem uma região de solo permanentemente úmido, encharcado ou até mesmo alagado e, conseqüentemente, o arroz apresenta constante rebrota ou até mesmo hábito perene (Rosa et al., 2006). Na área de cerrado, as plantas apresentam, predominantemente, hábito anual, com propagação por sementes. Elas se desenvolvem à medida que aumenta o nível das águas na estação chuvosa, e desaparecem na estiagem (Rangel et al., 2006). Provavelmente, a permanência de plantas de arroz em solo do ambiente de mata, propicie a manutenção de elevado número de

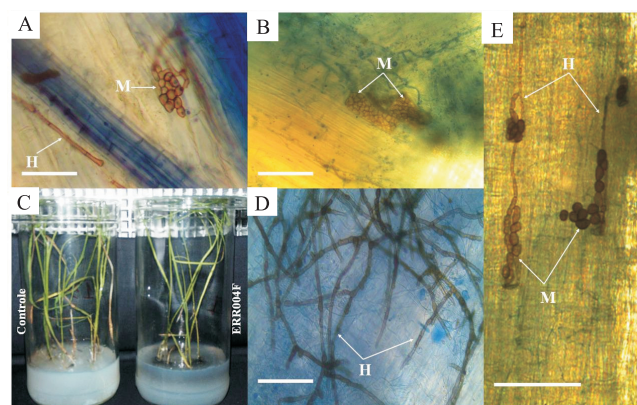
propágulos de DSEF no solo, o que favoreceria a maior colonização das plantas.

Foram obtidos 105 isolados das raízes de *O. glumaepatula*, dos quais 50 apresentaram micélios melanizados e septados, portanto, foram considerados DSEF. Destes 50, cinco foram inoculados in vitro em plantas de *O. glumaepatula*, tendo-se constatado que quatro deles, apesar de produzirem estruturas características de DSEF, apresentaram comportamento de fitopatógeno e influenciaram negativamente o desenvolvimento das plantas. Apenas um isolado (ERR004F) foi capaz de colonizar o córtex das raízes e produzir estruturas características de DSEF, como microescleródios e hifas septadas, em plantas saudáveis (Figura 2). Esse isolado também foi submetido à inoculação em plantas de arroz comercial, tendo-se observado a presença de estruturas características de DSEF, sem ocorrência de sintoma de patogenicidade na planta.

A obtenção de isolados com características culturais similares às dos DSEF que, após a reinoculação no hospedeiro original, desencadeiam reações de patogenicidade, tem se mostrado comum em trabalhos de prospecção destes fungos (Yuan et al., 2010). Porém, também é possível encontrar isolados fúngicos pertencentes a gêneros patogênicos em arroz silvestre que, quando submetidos à inoculação em *O. sativa*,



**Figura 1.** Percentagem de colonização por fungos endofíticos "dark septate" em plantas de *Oryza glumaepatula*, coletadas em áreas de cerrado – Alagada, local com solo alagado; Seca, local com solo seco – e de mata – Juvenil, plantas em estágio juvenil; Reprodutiva, plantas em estágio reprodutivo –, no Estado de Roraima. Médias seguidas de letras iguais, no mesmo ambiente, não diferem entre si, pelo teste t de Bonferroni, a 10% de probabilidade. As barras indicam o erro-padrão da média.



**Figura 2.** Colonização de plantas de *Oryza glumaepatula*, coletadas em área de cerrado e de mata, do Estado de Roraima, por fungos endofíticos "dark septate". Microescleródios (M) e hifas melanizadas septadas (H), em plantas coletadas em área de cerrado (A) e mata (B). Plantas saudáveis de *O. glumaepatula*, sem inoculação (controle), e submetidas à inoculação com o isolado ERR004F (C). Hifas melanizadas septadas do isolado ERR004F em *Oryza sativa* (D) e em *O. glumaepatula* (E), após 30 dias de inoculação. Linhas nas figuras indicam 0,5 mm.

não desencadeiam os sintomas de patogenicidade e promovem o crescimento vegetal (Yuan et al., 2010). A obtenção de um isolado capaz de colonizar as raízes de *O. glumaepatula* e, especialmente, de *O. sativa* constitui uma importante perspectiva para a avaliação e seleção de isolados de fungos promotores de crescimento de arroz comercial, que sejam de fácil manuseio em laboratório.

O comportamento diferenciado desses fungos, em laboratório, indica que há uma grande diversidade de DSEF associados, especialmente porque esses fungos apresentam elevado polimorfismo. Estudos de taxonomia e experimentos de inoculação podem revelar a diversidade destes fungos, bem como demonstrar seu potencial biotecnológico para o arroz comercial. A taxonomia polifásica tem sido utilizada na descrição de diversas espécies, como *Harpophora oryzae*, isolada de raízes de *O. granulata* na China (Yuan et al., 2010).

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade de Federal de Roraima, e à Embrapa Roraima, pelo suporte financeiro e estrutural.

### Referências

AHLICH, K.; SIEBER, T.N. The profusion of dark septate endophytic fungi in non-mycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. **New Phytologist**, v.132, 259-270, 1996.

BRUNDRETT, M.C.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZU, N. **Working with mycorrhizas in forest and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 374p.

CHEN, X.M.; DONG, H.L.; HU, K.X.; SUN, Z.R.; CHEN, J.A.; GUO, S.X. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.29, p.328-337, 2010.

DETMANN, K. da S.C.; DELGADO, M.N.; REBELLO, V.P.A.; LEITE, T. de D.; AZEVEDO, A.A.; KASUYA, M.C.M.; ALMEIDA, A.M. de. Comparação de métodos para a observação de fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo dark

septate em espécies nativas de Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1883-1890, 2008.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v.84, p.489-500, 1980.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 31p. (Circular, 347).

LINGFEI, L.; YANG, A.; ZHAO, Z.W. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in Southwest China. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.367-373, 2005.

MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. **Studies in Mycology**, v.53, p.173-189, 2005.

MARINS, J.F. de; CARRENHO, R.; THOMAZ, S.M. Occurrence and coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi in aquatic macrophytes in a tropical river-floodplain system. **Aquatic Botany**, v.91, p.13-19, 2009.

RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, C.; FONSECA, J.R.; SILVA, S.C. da; RABELO, R.R.; PEREIRA, J.A.; KAMINSKI, P.E. Mapeamento da distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Oryza*, com vistas à conservação dos parentes silvestres e das variedades crioulas de arroz (*O. sativa* L.). In: CORADIN, L. (Coord.). **Parentes silvestres das espécies de plantas cultivadas**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. Não paginado.

ROSA, M.S.; SANTOS, P.P dos; VEASEY, E.A. Caracterização agromorfológica interpopulacional em *Oryza glumaepatula*. **Bragantia**, v.65, p.1-10, 2006.

SAIF, S.R. The influence of stage of host development on vesicular-arbuscular mycorrhizae and endogonaceous spore population in field-grown vegetable crops I. Summer-grown crops. **New Phytologist**, v.79, p.341-348, 1977.

SCERVINO, J.M.; GOTTLIEB, A.; SILVANI, V.A.; PERGOLA, M.; FERNANDEZ, L.; GODEAS, A.M. Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.1753-1756, 2009.

YUAN, Z.L.; LIN, F.C.; ZHANG, C.L.; KUBICEK, C.P. A new species of *Harpophora* (Magnaporthaceae) recovered from healthy wild rice (*Oryza granulata*) roots, representing a novel member of a beneficial dark septate endophyte. **FEMS Microbiology Letters**, v.307, p.94-101, 2010.

ZHANG, G.X.; PENG, G.X.; WANG, E.T.; YAN, H.; YUAN, Q.H.; ZHANG, W.; LOU, X.; WU, H.; TAN, Z.Y. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Archives of Microbiology**, v.189, p.431-439, 2008.

Recebido em 31 de outubro de 2010 e aprovado em 28 de fevereiro de 2011