



Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos “dark septate” a partir de plantas de arroz¹

Isolation, storage and determination of fungal colonization “dark septate” from rice plants

Karen Gonçalves Ribeiro², Gilmara Maria Duarte Pereira^{3*}, Cátia Aparecida Mosqueira⁴, Alexandre Cardoso Baraúna⁵, Marcos José Salgado Vital⁶, Krisle da Silva⁷, Jerri Édson Zilli⁸

Resumo - Os fungos endofíticos conhecidos como DSEF ou “dark septate” podem ser promotores de crescimento vegetal. Com o objetivo de aperfeiçoar uma metodologia para o isolamento, armazenamento e determinação da colonização de raízes de arroz por fungos “dark septate” desenvolveu-se um estudo a partir da obtenção destes microrganismos em plantas de *Oryza glumaepatula* coletadas em ambientes amazônicos. As raízes das plantas de doze amostras de *O. glumaepatula* foram seccionadas, desinfestadas e dispostas em placas com o meio ágar-malte adicionado de cloranfenicol, sulfametazol e trimetropina. Os isolados obtidos foram avaliados quanto às características de “dark septate” e armazenados em água destilada com e sem a adição de glicerol. Cinco isolados fúngicos considerados “dark septate” foram reinoculados em plantas de *O. glumaepatula* e em *O. sativa* e, também, caracterizados molecularmente através da amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2. O meio de cultura ágar-malte foi eficiente para a obtenção de “dark septate”, obtendo-se mais de 50 isolados. O armazenamento em água destilada e em água destilada adicionada de glicerol mostrou-se eficiente para a manutenção das culturas fúngicas por pelo menos 12 meses. Os cinco isolados fúngicos reinoculados foram capazes de colonizar tanto raízes *O. glumaepatula* quanto *O. sativa*, não desencadeando sintomas de patogenicidade. A análise molecular mostrou que estes fungos apresentam baixa similaridade entre eles e não possuem similaridade com fungos “dark septate” já descritos, indicando que a metodologia empregada permitiu a obtenção de espécies fúngicas diversas e que a espécie *O. glumaepatula* abriga alta diversidade deste grupo de fungos.

Palavras-Chave - Amazônia. DSEF. *Oryza glumaepatula*. *Oryza sativa*.

Abstract - Endophyte fungi known as DSEF can be plant-growth-promoting. Aiming to improve a methodology for the isolation, storage and determine the rice roots colonization by “dark septate”, a study was developed based on the achievement of these microorganisms in *Oryza glumaepatula* plants collected in Amazon region. The plant roots of twelve *O. glumaepatula* samples were sectioned, disinfected, and placed in plates with agar-malte medium added of chloramphenicol, sulphametazole and trimetropin. The isolates were evaluated in relation of dark septate characteristics and stored in distilled water, and in distilled water added of glycerol. Five isolates considered dark septate were re-inoculated in *O. glumaepatula* and *O. sativa*, and also analyzed through amplification and sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region. The agar-malte medium was efficient to isolate dark septate, and more than 50 isolates were obtained. The distilled water and also distilled water added of glycerol were efficient to maintain the fungus culture at least 12 months. The five isolates re-inoculated were able to colonize both *O. glumaepatula* and *O. sativa*, without pathogenic symptoms observed. The molecular approach revealed that these fungus are not similar to each other and also to others dark septate already described. These results show that the proposed methodology was efficient to obtain distinct fungus species and *O. glumaepatula* is a host to high diversity of this fungus group.

Key words - Amazon. DSEF. *Oryza glumaepatula*. *Oryza sativa*.

*Autor para correspondência

¹Enviado para publicação em 26/08/2011 e aprovado em 29/08/2011

²Mestranda do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais (PRONAT UFRR), karenkgr@gmail.com

³Professora da Universidade Federal de Roraima, gmdpereira@hotmail.com

⁴Graduanda da Faculdade Roraimense de Ensino Superior, catia.ap.mosqueira@gmail.com

⁵Mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia da UFRR (POSAGRO – UFRR/Embrapa Roraima), alexandre.barauna.bio@gmail.com

⁶Professor da Universidade Federal de Roraima, marcos.vital@pq.cnpq.br

⁷Pesquisadora da Embrapa Roraima, krisle@cpafrr.embrapa.br

⁸Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, zilli@cnpab.embrapa.br

Introdução

Muitas espécies vegetais coexistem com microrganismos no ambiente, porém, sua capacidade de associação, que é extremamente desejável do ponto de vista biológico, ambiental e econômico, pode ser perdida durante as etapas de seleção e melhoramento vegetal (YUAN *et al.*, 2010). Muitos dos microrganismos que se associam aos vegetais são endofíticos e auxiliam no seu desenvolvimento, o que torna o processo de isolamento na natureza uma etapa importante e crítica para a biotecnologia (SILVANI *et al.*, 2008; YUAN *et al.*, 2010).

Fungos endofíticos conhecidos como DSEF ou “dark septate” são caracterizados por apresentarem pigmentação escura intensa, formarem hifas septadas e microescleródios que crescem inter e intracelularmente às células do córtex do vegetal (JUMPPONEN; TRAPPE 1998; BARROW; AALTONEN, 2001). Este grupo de fungos que apresenta ampla distribuição e é frequentemente encontrado em ambientes estressantes, como solos oligotróficos, inclui espécies comuns do solo como saprofíticos, simbióticos, bem como patogênicos (BARROW; AALTONEN, 2001; MANDYAM; JUMPPONEN, 2005). Além disso, constituem um grupo fúngico parafilético e colonizam as raízes de uma ampla variedade de espécies de gramíneas, como o arroz (YUAN *et al.*, 2011).

Na China, a associação entre *Oryza granulata* e fungos dark septate tem sido relatada (YUAN *et al.*, 2010), enquanto no Brasil, há relatos da associação destes fungos com a espécie *O. glumaepatula* em áreas amazônicas (PEREIRA *et al.*, 2011).

Alguns autores têm sugerido que os DSEF sejam capazes de estabelecer associações semelhantes aos fungos micorrízicos; atuando como promotores do crescimento vegetal, principalmente por facilitarem a absorção de nutrientes como o fósforo e nitrogênio (SCERVINO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010), inclusive com a produção de enzimas extracelulares capazes de hidrolisar compostos complexos de carbono, nitrogênio e fósforo (MANDYAM; JUMPPONEN, 2005). Além disso, tem sido sugerido que a melanização da parede celular fúngica e, a consequente produção de hifas melanizadas, representa fator que contribui para a adaptação e sobrevivência do hospedeiro a condições adversas, uma vez que a melanina teria um papel importante na eliminação de radicais de oxigênio gerados durante o estresse abiótico (REDMAN *et al.*, 2002).

De uma forma geral, ao contrário dos fungos micorrízicos arbusculares, os DSEF não são biotróficos obrigatórios, o que torna possível seu cultivo e multiplicação em meio de cultura. Esse fato confere

facilidade e rapidez ao isolamento e a estruturação de coleções fúngicas, processos de grande relevância para dar suporte às pesquisas futuras de avaliação do potencial como promotores de crescimento vegetal. Neste sentido, torna-se necessário a otimização dos métodos de isolamento, de cultivo, de determinação da percentagem de colonização e de armazenamento desses fungos.

A manutenção de uma coleção de DSEF deve levar em consideração a conservação dos aspectos morfológicos, fisiológicos, genéticos e metabólicos dos isolados, pois essas características são requeridas para estudos de taxonomia, e de produção de substâncias de interesse comercial e industrial (BAKER; JEFFRIES, 2006). Em geral, tanto o isolamento quanto o cultivo de DSEF são feitos em meios batata-dextrose-ágar (HUO; GUO, 2009; YUAN *et al.*, 2010) e em meio ágar malte (UPSON *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011; SILVANI *et al.*, 2008). Por outro lado, os métodos mais utilizados para a preservação incluem: sílica gel (GENTLE; SCOTT, 1979), nitrogênio líquido (STALPERS *et al.*, 1987), congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (PASSARELL; MCGINNIS, 1994), liofilização (RYBNIKAR, 1995), óleo mineral (NEUFELD; SARQUIS, 2003), água destilada (CASTELANI, 1967) e solução salina com óleo mineral (BRILHANTE *et al.*, 2004).

Portanto, objetivou-se com este trabalho aperfeiçoar metodologias para o isolamento, armazenamento e determinação da colonização por DSEF de raízes de plantas de arroz das espécies *O. glumaepatula* e *O. sativa*, confirmando a diversidade genotípica dos isolados obtidos de *O. glumaepatula* através de análise molecular.

Material e métodos

Foram realizadas coletas de material vegetal entre os meses de setembro de 2009 e março de 2010 em área de cerrado no Município de Bonfim (N $02^{\circ} 58''$; W $60^{\circ} 21''$) e em área de mata próxima ao Parque Nacional do Viruá (N $01^{\circ} 24'$; W $60^{\circ} 59'$), no município de Caracará, ambos no Estado de Roraima. Ao todo foram coletadas doze amostras de plantas nativas em diferentes pontos em área de mata e de cerrado, sendo coletadas plantas em diferentes estágios vegetativos e em condições de solo alagado e seco. As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima em temperatura ambiente.

Para o isolamento dos DSEF, as raízes do arroz silvestre previamente lavadas em água potável foram seccionadas em fragmentos com aproximadamente 1 cm e desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% e peróxido de hidrogênio a 33% por 2 e

1 minuto, respectivamente (AHLICH; SIEBER; 1996). Os fragmentos de raízes de cada uma das doze amostras foram distribuídos em triplicata nas placas de Petri sobre o meio de cultura ágar-malte (ágar 15 g L⁻¹ e extrato de malte 20 g L⁻¹) suplementado com cloranfenicol (100 mg L⁻¹) e sulfametazol mais trimetropina (240 mg L⁻¹). As placas, no total de 36, foram incubadas a 28°C no escuro, sendo que o aparecimento das colônias fúngicas foi monitorado diariamente até o décimo quinto dia após o isolamento. As colônias fúngicas melanizadas que surgiram próximas às raízes foram imediatamente transferidas para meio ágar-malte e incubadas novamente a 28°C. Após o crescimento das colônias melanizadas, retirou-se fragmentos do micélio dentro de uma mesma placa, na região das bordas das colônias, aleatoriamente. Esses fragmentos foram dispostos em lâminas e cobertos com lamínula para visualização em microscópio. Aqueles isolados fúngicos que apresentaram colônias melanizadas e hifas septadas foram armazenados pelo método de Castellani (1967) em água destilada esterilizada e, também, em água destilada esterilizada adicionada de glicerol (100 mL L⁻¹), ambos a 5°C. A cada 90 dias, alguns dos fungos estocados foram aleatoriamente separados e repicados em meio ágar-malte para verificação da viabilidade e manutenção das características fenotípicas, e no final de doze meses, averiguou-se o crescimento micelial e as características típicas de DSEF de todos os isolados fúngicos nesse mesmo meio.

Cinco isolados fúngicos, que apresentaram características fenotípicas distintas quando crescidos em meio ágar-malte, foram testados quanto à capacidade de colonização do sistema radicular das plantas de arroz. Para isso, conduziu-se um experimento *in vitro* utilizando-se o hospedeiro original (*O. glumaepatula*) e o arroz comercial (*O. sativa*). Os vasos para o plantio foram confeccionados a partir de garrafas de vidro e receberam 300 mL de meio esterilizado em autoclave (121°C; 60 min; 1 ATM) contendo solução de Hoagland ½ força (HOAGLAND; ARNON, 1950) e ágar 6 g L⁻¹. As sementes de ambas as espécies de arroz tiveram a casca removida manualmente, foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (2 - 4%) e pré-germinadas em ágar-água (9 g L⁻¹). Posteriormente, foram transplantadas seis plântulas de arroz por vaso, os quais foram acondicionados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, temperatura e umidade relativa do ar variando de 25 a 28°C e 60-70%, respectivamente. Após cinco dias do transplantio realizou-se a inoculação dos vasos depositando-se sobre o meio três discos de meio ágar-malte com aproximadamente 3 mm de diâmetro contendo o micélio de cada isolado fúngico crescido por quatro dias. Semanalmente, cada vaso recebeu 1 mL de água destilada esterilizada para evitar a dessecação do meio.

As plantas foram coletadas após seis semanas da inoculação, sendo o sistema radicular seccionado em fragmentos de aproximadamente 1 cm e fixados em FAA (formol, ácido acético e álcool etílico, na proporção 1:1:5, v/v por 60 minutos). Posteriormente, as raízes foram diafanizadas por imersão em solução de KOH 10% à temperatura ambiente por aproximadamente 50 minutos. Após este processo, as raízes foram neutralizadas utilizando solução de HCl a 2% por 5 minutos e coradas por imersão em solução de azul de tripano a 0,05% em lactoglicerol (ácido láctico, glicerina e água, na proporção de 2:1:1) a 70°C por 10 minutos (BRUNDRETT *et al.*, 1996). A presença de microescleródios e hifas melanizadas septadas foi observada sob microscópio óptico (Marca Leica; Modelo 2500DM) em aumento de 40X e registradas utilizando-se câmera digital (Marca Leica; modelo DFC 295). A determinação da percentagem de colonização por DSEF foi realizada pelo método da contagem em lâmina (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980), onde 40 segmentos de raízes de aproximadamente 1 cm por planta foram tomados ao acaso e organizados paralelamente em uma lâmina de microscópio quadriculada (1 x 1 cm), com 3 repetições. Nas lâminas, todos os pontos de interseções das raízes com as linhas foram observados, sendo consideradas positivas aquelas em que foram visualizadas as estruturas típicas dos fungos DSEF. O cálculo da percentagem de colonização foi obtido pela média das três repetições, considerando o número de estruturas típicas observadas nos 40 fragmentos de raízes em cada lâmina. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância através do teste *F* e comparação de média pelo teste *t* de Student.

Os cinco isolados testados quanto à capacidade de colonização das plantas de arroz, também foram analisados em nível molecular. Para isso, a extração do DNA foi realizada utilizando-se o Kit de extração Invisorb® Spin Plant Mini (Invitex) com adaptações. O micélio de cada isolado fúngico foi crescido em meio ágar-malte conforme descrito anteriormente por aproximadamente quatro dias. Após esse período, o micélio foi retirado da placa com auxílio de uma espátula estéril e colocado em microtubo com capacidade de 1,5 mL. Como adaptação ao protocolo de extração de DNA do fabricante, optou-se por adicionar sobre o micélio raspado 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, Na-EDTA 0,005 M, NaCl 0,01 M e SDS 1%) (SCHWIGER; TEBBE, 1998) e incubação a -20 °C por 1h. Após o período de incubação, o micélio fúngico foi triturado com o auxílio de um pistilo laboratorial descartável e adicionou-se 40 µL de proteinase K (50 mg mL⁻¹). Essa mistura foi homogeneizada e incubada sob agitação (65°C por 1h). Ao final desse período seguiram-se as etapas de separação e purificação do DNA propostas pelo fabricante. Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

Para a análise molecular, foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores, ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') que amplificam as regiões espaçadoras internas 1 e 2 do rDNA, além do 5.8S rDNA (ITS1-5.8-ITS2) (WHITE *et al.*, 1990). Para 50 µL de reação foram utilizados: 5 µL de tampão, 2 µL de MgCl₂ 25 mM; 2 µL de dNTP 10 mM; 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador 10 pmol e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase 5U. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler®, Alemanha. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial (94°C por 1 min), 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (55°C por 1 min), extensão (72°C por 1 min) e uma extensão final (72°C por 5 min).

O sequenciamento parcial dos fragmentos amplificados foi realizado diretamente a partir do produto de PCR utilizando o iniciador ITS1, sendo a corrida realizada em sequenciador 3730xl. As sequências obtidas foram submetidas ao “*Basic Local Alignment Search Tool*” -BLAST- e posteriormente realizou-se a comparação com as sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). O alinhamento múltiplo das sequências e análise filogenética foram realizados através do método “Neighbor-joining” com cálculo da distância pelo modelo “Kimura’s 2-parameter” com 1000 repetições utilizando o programa MEGA 5.1 (TAMURA *et al.*, 2011).

Resultados e discussão

Após a incubação das amostras de raízes oriundas de *O. glumaepatula* em meio ágar-malte verificou-se o crescimento de fungos em todas as placas, tendo o crescimento iniciado principalmente a partir das extremidades de cada fragmento de raiz, o que evidencia que os fungos isolados são endofíticos. Após o período de incubação foram visualizados pouco mais de 100 colônias fúngicas e praticamente não se verificou a presença de bactérias, o que mostra que a suplementação do meio ágar-malte com antibióticos restringiu a contaminação bacteriana e favoreceu a recuperação e a purificação dos isolados de DSEF. O uso de antibióticos no meio de cultura faz-se necessário, pois muitas bactérias presentes nas raízes atuam como antagonista de fungos, não permitindo o seu crescimento (CAO *et al.*, 2005; SILVANI *et al.*, 2008). A suplementação do meio ágar-malte com outros antibióticos como a cloromicetina também tem mostrado eficiência para o isolamento de fungos endofíticos a partir das raízes de outras espécies de *Oryza*. Alternativamente, o isolamento de fungos DSEF a partir de raízes de várias espécies vegetais, livres de contaminação bacteriana, tem

sido possível pela imersão completa das raízes previamente desinfestadas em uma solução contendo estreptomicina e ampicilina (200 mg L⁻¹) e tetraciclina (100 mg L⁻¹) por 15 minutos com posterior transferência dos fragmentos para gotas de Gel-Gro® em meio de cultura suplementado com a mesma solução de antibióticos (SILVANI *et al.*, 2008).

Todas as colônias fúngicas obtidas foram analisadas em microscópio e constatou-se que aproximadamente 50% apresentaram micélio melanizado e hifas septadas, que são estruturas características de DSEF (Figura 1A e B), o que mostra que o processo de isolamento foi bem sucedido. Estes resultados se assemelham com observações em outros trabalhos de isolamento, demonstrando a efetividade no processo de desinfestação dos fragmentos de raízes de arroz e obtenção de isolados de fungos endofíticos (MÁRQUEZ *et al.*, 2009; RODRIGUES, 2010).

Quanto ao armazenamento dos isolados de DSEF, foi possível observar que pelo menos até 12 meses após a estocagem todos mantiveram sua viabilidade e as características fenotípicas iniciais, mostrando serem métodos adequados para a manutenção da coleção por, pelo menos, médio prazo. Na literatura não há uma indicação de um método padrão utilizado na preservação adequada de fungos (RODRIGUES *et al.*, 1992; BUENO; GALLARDO, 1998), mas a escolha do mesmo deve considerar principalmente a capacidade de manutenção das características fenotípicas e genotípicas das culturas estocadas (SILVA *et al.*, 2010).

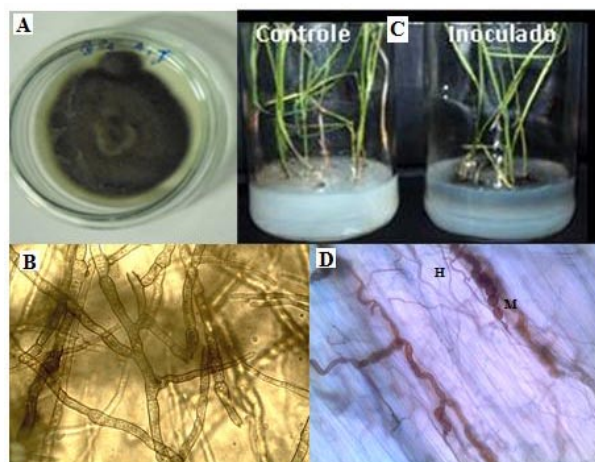


Figura 01 – Morfologia das colônias de isolados de DSEF obtidos de raízes de *Oryza glumaepatula* cultivados em meio ágar malte a 28 °C (A) e formação do micélio melanizado e septado (aumento de 100X) (B); plantas de *O. glumaepatula* inoculadas com isolado Og01 crescidas em vasos contendo meio com solução de Hoagland (C); e hifas septadas e melanizadas e microscleródios no interior da raiz de *O. glumaepatula* (aumento de 40X) (D). Hifas (H) e Microscleródios (M).

No ensaio de colonização observou-se que todos os fungos cresceram vigorosamente no meio de cultivo e as plantas de arroz também com bom crescimento apresentaram-se saudáveis, tanto a parte aérea quanto as raízes, até o final do período de avaliação (Figura 1C). Considera-se que a estratégia de cultivo das plantas de arroz de ambas as espécies em meio contendo solução de Hoagland ½ força adicionado de ágar foi adequado para o desenvolvimento das plantas inoculadas com os diferentes isolados fúngicos. Para a observação da colonização radicular, os fragmentos de raízes foram fixados, diafanizados, neutralizados e corados com azul de tripano em lactoglicerol. Entretanto, a exposição das raízes ao KOH na temperatura de 75°C, originalmente proposta para a diafanização (BRUNDRETT *et al.*, 1996), ocasionou a desintegração quase que total das raízes de ambas as espécies de arroz. Alternativamente, as raízes foram expostas ao KOH na temperatura ambiente quando se obteve um resultado satisfatório.

A análise das raízes em microscópio permitiu verificar que todos os fungos testados colonizaram o córtex das raízes de ambas as espécies de arroz, formando hifas septadas e microescleródios, que são estruturas características da associação entre DSEF e a planta hospedeira (Figura 1D). Para a quantificação da percentagem de colonização das raízes de ambas as espécies de arroz por DSEF utilizou-se o método originalmente proposto para fungos micorrízicos (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980), o qual se mostrou eficiente e de fácil aplicação. Ao final de seis semanas observou-se que a colonização das raízes de arroz por hifas variou de 20 a 60%, sendo de forma geral maior para a espécie *O. sativa* (Tabela 1). Por outro lado, a colonização por microescleródios variou de 1 a 30%, sendo que os diferentes isolados fúngicos não diferiram quanto à capacidade de colonização radicular das

Tabela 1 - Percentagem de colonização das raízes de *Oryza glumaepatula* e *Oryza sativa* inoculadas com diferentes isolados de DSEF sob condições controladas

Fungo	Hifas (%) ¹		Microescleródios (%) ¹	
	<i>Oryza glumaepatula</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza glumaepatula</i>	<i>Oryza sativa</i>
Og01	39 bB	66 aA	27 aA	30 aA
Og02	24 cB	52 bA	7 bB	22 bA
Og03	47 aA	43 cA	4 bA	4 cA
Og04	31 bcA	38 cA	1 bA	3 cA
Og05	29 cB	40 cA	5 bA	2 cA

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, dentro de hifas ou microescleródios, não diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste *t* de Student. C.V.(%) igual a 11,4 para colonização por hifas e 34,9 para microescleródios.

duas espécies de arroz, com exceção para o isolado Og02 (Tabela 1). O isolado Og01 apresentou maiores percentagens de colonização por hifas e também por microescleródios quando inoculado na espécie *O. sativa*, havendo diferenças pouco expressivas entre os isolados na espécie *O. glumaepatula* (Tabela 1). Não existem muitas informações indicando a percentagem de colonização por DSEF em plantas de arroz, porém em um amplo estudo realizado na Índia com 50 espécies de gramíneas foi verificada uma taxa de colonização de raízes por DSEF entre 1-49% (SATHIYADACH *et al.*, 2010), corroborando os dados observados nesse estudo.

Após o sequenciamento, as sequências de DNA da região ITS1-5.8S-TS2 obtidas para cada um dos cinco isolados fúngicos foram submetidas à análise no BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) e observou-se que nenhum dos fungos avaliados apresentou similaridade com outros DSEF já descritos e presentes no banco de dados (Tabela 2). Além disso, quando o agrupamento foi realizado pelo método “Neighbor joining” usando o modelo “Kimura two-parameter” observou-se que os isolados apresentam similaridade genotípica entre si inferior a 95%, indicando alta diversidade genotípica entre eles (Figura 2). Por outro lado, quando consideradas as sequências de outros fungos que não DSEF, observou-se que alguns dos isolados chegaram a apresentar até 100% de similaridade genotípica, enquanto o isolado Og01 mostrou apenas 87% de similaridade com outras espécies já descritas (Tabela 2).

Os isolados fúngicos Og02 e Og03 apresentaram pelo menos 96% de similaridade com sequências de *Leptosphaeria* sp. e *Phaeoacremonium* sp., respectivamente, enquanto os isolados Og04 e Og05 apresentaram similaridade de 100% com sequências de *Dothideomycetes* e *Cladosporium*, o qual pertence a esta classe, e *Mycosphaerella heimii*, respectivamente (Tabela 2). Também se observou que os cinco isolados fúngicos apresentaram similaridade que chegou a até 98% com sequências de fungos endofíticos associadas às raízes de plantas, que foram depositadas no NCBI, mas ainda não foram descritas, sendo importante destacar o isolado Og02 que apresentou 98% de similaridade a um fungo isolado da espécie de arroz silvestre *O. granulata* na China (Tabela 2).

Todos os gêneros em que os isolados fúngicos apresentaram similaridade (*Cladosporium*, *Mycosphaerella*, *Phaeoacremonium* e *Leptosphaeria*) são comumente reportados por possuírem espécies fitopatogênicas (EL-MORSY, 2000; CROUS *et al.*, 2006; APTROOT, 2006; MÁRQUEZ *et al.*, 2010) e, também, espécies de saprófitos de solo e endofíticos (PETERSON *et al.*, 2008), o que mostra que estes gêneros são ubíquos, apresentam habilidade na ocupação de nichos ecológicos diversos e são considerados endofíticos com múltiplos hospedeiros (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998). Por outro

Tabela 2 – Similaridade genotípica de isolados DSEF obtidos de *Oryza glumaepatula* no Estado de Roraima a partir do sequenciamento da região ITS1-5.8-ITS2 com sequências de fungos obtidas no ncbi e analisadas pelo BLAST

Fungo	Acesso no NCBI	Máximo Score	Identidade (%)	Descrição	Origem	Referência
Og01	DQ068354	499	87	Fungal sp.	Folhas de <i>Picea glauca</i> , Canadá	Não publicado
	GU205097	438	84	<i>Phialemonium curvatum</i>	Sementes de <i>Zea mays</i> , Illinois, EUA	Não publicado
	FJ362200	427	86	Uncultured root-associated fungus	Raízes de <i>Yucca glauca</i> , Novo México, EUA	Khidir <i>et al.</i> (2010)
	FJ362199	427	86	Uncultured root-associated fungus	Raízes de <i>Yucca glauca</i> , Novo México, EUA	Khidir <i>et al.</i> (2010)
Og02	FJ450030	883	98	Fungal endophyte	<i>Dendrobium</i> sp., China	Não publicado
	HM008629	881	98	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Oryza granulata</i> , China	Não publicado
	FJ612653	878	98	Fungal sp.	Sementes de <i>Cecropia insignis</i> , Ilha Barro Colorado, Panamá	U'ren <i>et al.</i> (2009)
	EU686970	878	98	Fungal endophyte	Tecido fotossintético assintomático de <i>Oplismenus hirtellus</i> , EUA	Não publicado
Og03	EU977266	893	97	Fungal endophyte sp.	<i>Pouteria bilocularis</i> , Peru	Smith <i>et al.</i> (2008)
	HQ882797	891	96	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	Estromas negros, EUA	Não publicado
	EU128051	887	97	<i>Phaeoacremonium fuscum</i>	<i>Prunus salicina</i> , África do Sul	Damm <i>et al.</i> (2008)
	EU128050	887	97	<i>Phaeoacremonium fuscum</i>	<i>Prunus salicina</i> , África do Sul	Damm <i>et al.</i> (2008)
Og04	HQ588318	935	100	Uncultured <i>cladosporium</i>	Mar do sul da China	Não publicado
	GQ153092	935	100	<i>Dothideomycetes dothideomycetes</i>	Tecido fotossintético assintomático de <i>Juniperus deppeana</i> , EUA	Hoffman; Arnold (2010)
	GQ153083	935	100	<i>Dothideomycetes dothideomycetes</i>	Tecido fotossintético assintomático de <i>Juniperus deppeana</i> , EUA	Hoffman; Arnold (2010)
	GQ153060	935	100	<i>Dothideomycetes dothideomycetes</i>	Tecido fotossintético assintomático de <i>Juniperus deppeana</i> , EUA	Hoffman; Arnold (2010)
Og05	EU851921	894	99	<i>Mycosphaerella heimii</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i> , Uruguai	Pérez <i>et al.</i> (2009)
	EU853466	894	99	<i>Mycosphaerella heimii</i>	Myrtaceae nativa do Uruguai	Não publicado
	GQ852745	889	100	<i>Mycosphaerella heimii</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i> , Austrália	Crous <i>et al.</i> (2009)
	EU882121	887	100	<i>Mycosphaerella heimii</i>	<i>Eucalyptus</i> sp., Vietnam	Cheewangkoon <i>et al.</i> (2008)

lado, o fato de nenhum dos cinco isolados avaliados apresentarem similaridade com fungos já descritos como DSEF e, serem pouco similares entre si, mostra que a estratégia utilizada para isolamento permitiu a obtenção de fungos genotipicamente diversos. Também vale destacar que todos os cinco fungos estudados apresentaram similaridade com ascomicetos, aos quais os DSEF já descritos pertencem (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998).

A análise molecular é um bom indicativo das prováveis espécies as quais novos isolados fúngicos pertencem, embora com a ressalva de que não deve ser utilizada isoladamente. Partindo deste pressuposto, pode-se inferir que os isolados fúngicos avaliados que apresentaram alta similaridade com sequências de espécies descritas possivelmente pertencem a grupos de fungos que também são reportados como fitopatogênicos.

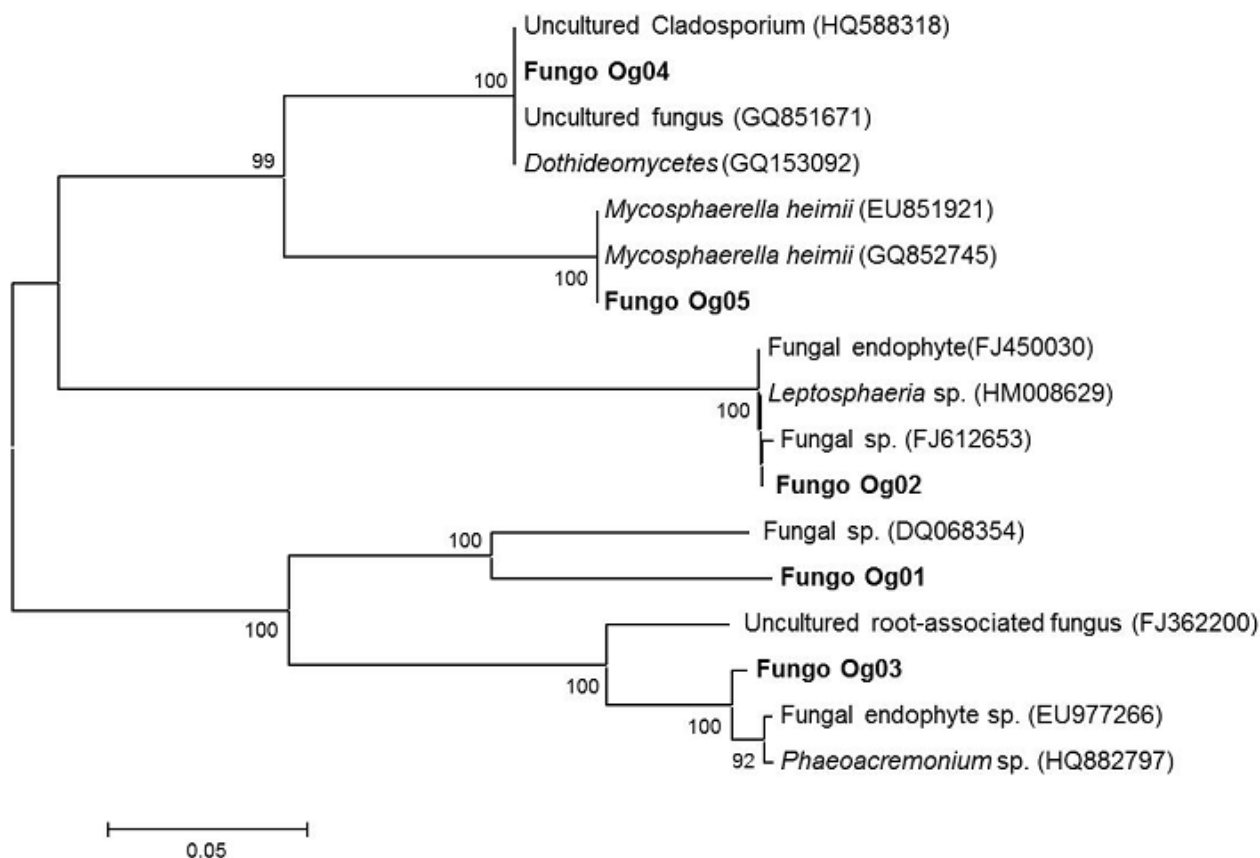


Figura 2 - Árvore filogenética da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA dos fungos isolados de arroz silvestre no Estado de Roraima. Árvore foi construída pelo método “Neighbor-joining” e cálculo da distância utilizando o modelo Kimura-two-parameter. Somente valores acima de 50% (1000 repetições) são apresentados.

Interessantemente, no experimento de reinoculação, todos os cinco fungos infectaram tanto plantas de arroz silvestre, que foi o hospedeiro original, quanto o arroz comercial e não ocasionaram patogenicidade às plantas. Isto indica que estes isolados devem representar novos grupos de DSEF ainda não estudados, e ainda no caso do isolado Og01, o qual apresentou similaridade menor que 90% com outros fungos na análise pelo BLAST, pode representar uma nova espécie ou gênero ainda não descrito, ou pelo menos não identificado molecularmente. De fato, a obtenção de isolados fúngicos em arroz silvestre com características culturais similares a DSEF, pertencentes a gêneros patogênicos que não desencadeiam os sintomas de patogenicidade em *O. sativa*, tem se mostrado comum em trabalhos de prospecção destes fungos, havendo inclusive a promoção do crescimento vegetal por eles (YUAN *et al.*, 2010).

Desta forma, a estratégia adotada para o isolamento de fungos DSEF mostrou-se adequada para a obtenção de elevado número de isolados fúngicos pouco similares

genotipicamente, fato que foi eficientemente comprovado pela análise da região ITS. Além disso, a estratégia de armazenamento mostrou-se adequada para a manutenção da coleção por pelo menos doze meses. Por sua vez, a estratégia de reinoculação dos isolados em plantas de arroz e a determinação de colonização das raízes foram eficazes para estudar a capacidade associativa dos isolados fúngicos. Ademais, a alta diversidade genotípica investigada através da região ITS também demonstra elevada diversidade de DSEF associados com espécies de arroz silvestre que ocorrem em ambientes amazônicos.

Conclusões

O meio de cultura ágar-malte, água destilada ou água destilada mais glicerol e a estimativa da colonização através da lâmina quadriculada são, respectivamente, métodos eficientes para o isolamento, armazenamento e determinação da percentagem de colonização de plantas de arroz por DSEF.

A espécie *Oryza glumaepatula* abriga alta diversidade de DSEF, inclusive com espécimes ainda não identificados molecularmente.

Literatura científica citada

- AHLICH, K.; SIEBER, T.N. The profusion of dark septate endophytic fungi in non-mycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. **New Phytologist**, **132**: 259-270. 1996
- APTROOT, A. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 2. Conspectus of *Mycosphaerella*. **Biodiversity Series**, 5:1-231. 2006.
- BAKER, M.; JEFFRIES, P. Use of commercially available cryogenic vials for long-term preservation of dermatophytes fungi. **Journal Clinical Microbiology**, **44**: 617-618. 2006.
- BARROW, J. R.; AALTONEN, R.E. A method of evaluating internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and how they are influenced by host physiological activity. **Mycorrhiza**, **11**:199-205. 2001.
- BRILHANTE, R. S. *et al.* Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**, **42**: 499-504. 2004.
- BRUNDRETT, M. C. *et al.* **Working with mycorrhizas in forest and agriculture**. ACIAR, Canberra, Austrália, 374pp. 1996.
- BUENO, L.; GALLARDO, R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. **Revista Iberoamericana de Micología**, **15**: 166- 8. 1998.
- CAO, L. *et al.* Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiological Letters**, **247**: 147-152. 2005.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. 1967. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, **70**: 181-184.
- CHEEWANGKON, R. *et al.* Species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on *Eucalyptus* leaves from Thailand. **Persoonia**, **21**: 77- 91. 2008.
- CHEN, X.M. *et al.* Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. **Journal of Plant Growth Regulation**, **29**: 328-337. 2010.
- CROUS, P.W. *et al.* *Metulocladosporiella* gen. nov. for the causal organism of *Cladosporium speckle* disease of banana. **Mycological Research**, **110**: 264-275. 2006.
- CROUS, P.W. *et al.* Novel species of *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae*. **Persoonia**, **23**: 119-146. 2009.
- DAMM, U. *et al.* Novel *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of *Prunus* trees. **Persoonia**, **20**: 87-102. 2008.
- EL-MORSY, E.M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. **Fungal Diversity**, **5**: 43-54 . 2000.
- GENTLE, J. C.; SCOTT, E. The preservation of medically important fungi. **Sabouraudia**, **17**: 415-418. 1979.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, **84**: 489-500. 1980.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. University of California Press, Berkeley, CA, USA, 31pp. 1950.
- HOFFMAN, M.T.; ARNOLD, A.E. Diverse bacteria inhabit living hyphae of phylogenetically diverse fungal endophytes. **Applied and Environmental Microbiology**, **76**: 4063-4075. 2010.
- HOU, X.Q.; GUO, S.X. Interaction between a dark septate endophytic isolate from *Dendrobium* sp. and roots of *D. nobile* seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology**, **51**: 374-381. 2009.
- JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. **New Phytologist**, **140**: 295-310. 1998.
- KHIDIR, H. H. *et al.* A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. **Journal of Arid Environments**, **74**: 35-42. 2010.
- MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. **Studies in Mycology**, **53**: 173-189. 2005.
- MÁRQUEZ, M.S. **Estudio de la micobiota endofítica asociada a las gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus***. 2009. Tese de doutorado, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Salamanca, Espanha. 272pp.
- MÁRQUEZ, S.S. *et al.* **Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus***. **Fungal Diversity**, **41**:115-123. 2010.
- NEUFELD, P. M.; SARQUIS, M. I. M. Laboratory preservation of filamentous fungi by mineral oil method. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, **35**: 147-150. 2003.
- PASSARELL, L.; MCGINNIS, M. Viability of fungus cultures maintained at -70°C. **Journal Clinical Microbiology**, **30**: 1000-1004. 1994.
- PEREIRA, G. M. D. *et al.* Ocorrência de fungos endofíticos “dark septate” em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **46**: 331-334. 2011.
- PÉREZ, C. A. *et al.* *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. **Forest Pathology**, **39**: 349-360. 2009.
- PETERSON, L. R.; WAGG, C.; PUTLER, M. Association between microfungus endophytes and roots: do structural features indicate functions? **Botany**, **86**: 445-456. 2008.
- REDMAN, R. *et al.* Thermo tolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, **298**: 1581. 2002.
- RODRIGUES, E. G.; LIRIO, R. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **34**: 159-65. 1992.

- RODRIGUES, R. L. **Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult. F. (Velloziaceae) presentes em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins.** 2010. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais. 70pp.
- RYBNIKÁR, A. Long-term maintenance of lyophilized fungal cultures of the genera *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Paecilomyces* and *Trichophyton*. *Mycoses*, 145-147. 1995.
- SATHIYADACH, K.; MUTHUKUMAR, T.; UMA, E. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte fungal associations in South Indian grasses. *Symbiosis*, 52: 21-32. 2010.
- SCERVINO, J. M. *et al.* Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1753-1756. 2009.
- SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 4870-4876. 1998.
- SILVA, J. C. *et al.* Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30: 48-54. 2010.
- SILVANI, V. A. *et al.* A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:1259-1263. 2008
- SMITH, S. A. *et al.* Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. *PLoS ONE*, 3: 1-4. 2008.
- STALPERS, J. A.; HOOG, A.; VLUG, I. J. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. *Mycologia*, 79:82-89. 1987.
- TAMURA K. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). 2011.
- U'REN, J. *et al.* Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a neotropical pioneer tree: a case study for analysing fungal environmental samples. *Mycological Research*, 113: 432-449. 2009.
- UPSON, R. *et al.* Antarctic vascular plant species Taxonomic affinities of dark septate root endophytes of *Colobanthus quitensis* and *eschampsia antarctica*, the two native Antarctic vascular plant species. *Fungal Ecology*, 2: 184-196. 2009.
- WHITE, T. J.; BRUNS, S.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal genes for phylogenetics, p. 315-322. **PCR Protocols: A Guide to methods and applications.** Academic Press, San Diego, CA, USA. 1990.
- YUAN, Z. L. *et al.* 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*, 307: 94-101. 2010.
- YUAN, Z. L. *et al.* Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of *Muscodora* (xylariaceae). *The Journal of Microbiology*, 49 :15-23. 2011.