



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

KAREN GONÇALVES RIBEIRO

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE EM ARROZ SILVESTRE *Oryza
glumaepatula* Steud.**

Boa Vista

2011

KAREN GONÇALVES RIBEIRO

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE EM ARROZ SILVESTRE *Oryza
glumaepatula* Steud.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais – PRONAT, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção de recursos genéticos.

Orientador: Prof^o. Dr. Jerri Édson Zilli

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Gilmara M.

Duarte Pereira

Boa Vista

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

R484f Ribeiro, Karen Gonçalves.

Fungos Endofíticos Dark Septate em arroz silvestre *Oryza glumaepatula* Steud / Karen Gonçalves Ribeiro. - Boa Vista, 2011.

69p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jerri Édson Zilli.

Co-orientadora: Profa. Dra. Gilmara M. Duarte Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

1 – Fungos endofíticos. 2 – *Oryza glumaepatula* Steud. 3 – Amazônia. Título. II – Zilli, Jerri Édson (orientador). II – Pereira, Gilmara M. Duarte (co-orientadora).

CDU – 633.18

À minha família, cuja força, presença e amor, com certeza foram, são e serão sempre essenciais nas conquistas e realizações da minha vida.

Dedico

Agradecimentos

À Deus por todo amor e fidelidade a mim concedido. Não conseguiria se não fosse pela sua misericórdia.

Ao Dr. Jerri Édson Zilli e à Dra. Gilmara M. Duarte Pereira, pelo apoio, compreensão, críticas e sugestões muito oportunas nos momentos em que eu achava que não daria conta. Sou muito grata pela oportunidade de ter sido sua orientada.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais - PRONAT pelos ensinamentos transmitidos.

À Universidade Federal de Roraima e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais - PRONAT, pela oportunidade de cursar o mestrado.

Aos meus pais, Socorro e Guilherme pelo apoio, carinho e amor.

Ao meu marido, Bruno Rezende e minha irmã Dayane pelo incentivo diário, apoio, compreensão e por acreditarem que tudo daria certo. Nada teria sentido se vocês não estivessem ao meu lado.

Aos meus familiares pelo incentivo e paciência nos dias de ausência.

Aos colegas de turma 2009.2 pela convivência agradável.

Aos amigos do LabMicro, Aline Melo, Luiz, Cátia Aparecida e Izaías França pelo auxílio nos experimentos e análises, pelos momentos de descontração e por estarem ao meu lado em todas situações, muito obrigada.

Ao Giovane, do LabFitopatologia, pela amizade e por tantas vezes ceder os equipamentos do laboratório para a realização das análises.

Ao IBAMA por admitir que as coletas fossem realizadas em áreas que integram o Parque nacional do Viruá.

Ao Pesquisador da Embrapa, Vicente Gianlup, por permitir e disponibilizar sua área particular para a realização das coletas.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, pela parceria na realização do mestrado; por toda logística para realização dos trabalhos e orientação.

À Capes, pela bolsa de estudos.

À todas as pessoas que de uma maneira ou outra colaboraram com a realização deste trabalho.

***“Se enxerguei mais longe, foi por estar apoiado
sobre ombros de gigantes”***

(Isaac Newton)

RESUMO

Os fungos endofíticos do tipo “dark septate” podem ser promotores de crescimento vegetal. No entanto, ainda são poucos os estudos com este grupo de fungos. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar fungos DSEF obtidos a partir de 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 suplementado com Cloranfenicol e Sulmametazol mais Trimetropina. Os isolados obtidos foram avaliados quanto às características de “dark septate” e armazenados em água destilada e água destilada adicionada de glicerol. Todos os isolados fúngicos considerados DSEF foram reinoculados em plantas de *O. glumaepatula*, sendo 5 inoculados em *O. sativa* e, também, caracterizados geneticamente através da amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2. O meio de cultura ágar-malte foi eficiente para a obtenção de DSEF, obtendo-se 46 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. Todos 46 isolados fúngicos reinoculados foram capazes de colonizar raízes *O. glumaepatula* e 5 destes isolados foram capazes de colonizar *O. sativa*, não desencadeando sintomas de patogenicidade. A análise genética dos isolados mostrou que estes fungos apresentam baixa similaridade entre eles e não possuem similaridade com fungos DSEF já descritos e presentes no banco de dados do Genbank, 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: DSEF. *Oryza sativa*. Amazônia.

ABSTRACT

The endofphytic fungi such as “dark septate” or DSEF can be promoters of plant growth. However, there are few studies com this group of fungi. The objective of this study was to characterize DSEF fungi obtained from plants collected in enviroments *Oryza glumaepatula* Amazon. The plant roots of twelve *O. glumaepatula* samples were sectioned, disinfected, and placed in plates with agar-malte medium added of chloramphenicol and trimethoprim sulmametazol more. The isolates were evaluated in relation of dark septate characteristics and stored in distilled water, and in distilled water added of glycerol. All fungal isolates considered DSEF were reinoculated in plants of *O. glumaepatula*, and inoculated in 5 in *Oryza sativa* and also genetically characterized by amplifying and sequencing the region ITS1-5.8S-ITS2. The agar-malte medium was efficient to isolate DSEF, resulting in more than 46 isolates. The distilled water and also distilled water added of glycerol were efficient to maintain the fungus culture at least 12 months. All 46 fungal isolates were reinoculated to colonize roots *O. glumaepatula* and 5 of these isolates were able to colonize *O. sativa*, not trigger symptoms of pathogenicity. Genetics analysis of isolates showed that these fungi have low similarity between them and have no similarity to fungi DSEF already described and present in the database of Genbank, indicating that the methodology allowed the acquisition of several fungal species and the species *O. glumaepatula* houses high diversity of this group of fungi.

Keywords: DSEF. *Oryza sativa*. Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapas com os locais de coleta de solo e de plantas de <i>O. glumaepatula</i>	32
Figura 2	Estrutura da região rRNA ITS1-5.8S-ITS2, indicando a posição dos olinucleotídicos ITS1 e ITS4.....	38
Figura 3	Morfologia de fungos endofíticos melanizados isolados de raízes de arroz silvestre <i>O. glumaepatula</i> cultivados em meio ágar malte a 28 °C.	40
Figura 4	Estruturas de DSEF em raízes de arroz silvestre <i>O. glumaepatula</i> (aumento de 400X).....	41
Figura 5	Percentagem de colonização por fungos endofíticos “dark septate” em plantas de <i>Oryza glumaepatula</i> , 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.....	41
Figura 6	Árvore filogenética da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA dos fungos isolados de arroz silvestre no Estado de Roraima.....	51
Figura 7	Sequências de bases nucleotídicas de parte da região ITS2 de isolados de DSEF (grupo D) obtidos de <i>O. glumaepatula</i>	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Análise química dos substratos utilizados no experimento casa de vegetação.....	36
TABELA 2	Relação e quantidade de nutrientes aplicados em cada vaso para corrigir o solo.....	36
TABELA 3	Comportamento de fungos isolados de áreas de mata do Parque Nacional do Viruá e áreas de Cerrado e seus efeitos em experimento de inoculação <i>In vitro</i> em arroz silvestre <i>O. glumaepatula</i>	44
TABELA 4	Porcentagem de colonização das raízes de <i>Oryza glumaepatula</i> e <i>O. sativa</i> inoculadas com diferentes isolados de DSEF sob condições controladas.....	45
TABELA 5	Desempenho do arroz comercial <i>O. sativa</i> inoculado com diferentes isolados de DSEF sob condições controladas de casa de vegetação...	47

LISTA DE ABREVIações

AIA	Ácido indolacético
Al ⁺³	Íons de alumínio
BLAST	Basic Local Alignment Tool
BP	Pares de bases
C	Carbono
Cu	Cobre
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
DSEF	Fungos Endofíticos dark septate
FeSO ₄	Sulfato de Ferro
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
ITS	Inter transcribed space
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio
MMS	Meio Murashige-Skoog
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
NaNO ₃	Nitrato de cálcio
N	Nitrogênio
Na ₂ MoO ₄	Molibidato de Sódio
P	Fósforo
rRNA	RNA ribossomal
rDNA	Gene codificante do RNA ribossomal
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco
Zn	Zinco

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Isolamento e preservação de fungos endofíticos “dark septate”	39
4.2	Avaliação da colonização de DSEF em <i>O. glumaepatula</i>	40
4.3	Inoculação <i>in vitro</i> de isolados de DSEF em <i>O. glumaepatula</i>	43
4.4	Crescimento de <i>O. sativa em casa de vegetação</i> inoculado com DSEF.....	45
4.5	Identificação molecular dos Isolados de DSEF obtidos de <i>O. glumaepatula</i>	49
5	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de plantas não domesticadas coexistem com micro-organismos no ambiente, porém, a 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 destes micro-organismos são endofíticos e se associam aos vegetais auxiliando no seu desenvolvimento, o que torna o processo de isolamento dos mesmos 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 nas células do córtex do vegetal (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; BARROW; AALTONEN, 2001). Este grupo de fungos que apresenta ampla distribuição é frequentemente encontrado em ambientes estressantes, como solos oligotróficos, e são espécies comuns do solo como saprofíticos, simbióticos, bem como patogênicos (BARROW; AALTONEN, 2001; MANDYAM; JUMPPONEN, 2005). Além disso, constituem um grupo fúngico parafilético e apresentam ubiquidade nas raízes de ampla variedade de espécies de gramíneas, como o arroz (YUAN et al., 2011).

Alguns autores têm sugerido que os DSEF sejam capazes de estabelecer associações mutualísticas com seu hospedeiro, semelhante 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, representem 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, os DSEF não são biotróficos obrigatórios, como os fungos micorrízicos arbusculares, o que representa uma grande vantagem, pois torna possível seu cultivo e multiplicação em meio de cultura. Esse fato confere

facilidade e rapidez ao isolamento e à estruturação de coleções fúngicas, processos de grande relevância que podem dar suporte às pesquisas futuras de identificação da função destes fungos e ao estudo do seu potencial uso como promotores de crescimento vegetal.

Na China, a associação entre *Oryza granulata* e bactérias diazotróficas (ZHANG et al., 2008), e fungos endofíticos incluindo os “dark septate” (YUAN et al., 2010; 2011) têm sido relatadas. No Brasil, há relatos da associação entre *O. glumaepatula* e bactérias diazotróficas (SILVA et al., 2010) e DSEF (PEREIRA et al., 2011) em áreas de mata e de savana na Amazônia. Entretanto, embora existam relatos da associação entre espécies de arroz silvestre e DSEF, até o presente, a função ecológica destes fungos ainda não está totalmente elucidada, tampouco há clareza sobre métodos eficientes para o isolamento, estocagem e avaliação destes fungos nas plantas (YUAN et al., 2010).

Recentemente, algumas espécies de arroz silvestre têm sido estudadas quanto ao potencial de estabelecer associações com os DSEF (YUAN et al., 2010). A habilidade das espécies silvestres ocuparem nichos ecológicos de variações distintas faz com que tais plantas sejam reservatórios de uma rica diversidade de fungos que permanecem ainda desconhecidos. Neste sentido, este trabalho visou caracterizar fungos endofíticos do tipo “dark septate” associados ao sistema radicular de arroz silvestre, em áreas de mata e de savana do Estado de Roraima.

1.1 O gênero *Oryza*

O processo evolutivo e a domesticação do arroz levaram ao surgimento de espécies geneticamente adaptadas às variações edafoclimáticas, tornando o arroz o cereal mais cultivado e consumido no mundo (SILVA et al., 2007).

O arroz pertence ao gênero *Oryza*, família Poaceae, é uma planta anual ou perene (ROSA; SANTOS; VEASEY, 2006), pode se desenvolver em condições de solo alagado ou seco e, evidências sugerem que sua origem tenha sido em clima tropical onde, a partir de então, diversas linhagens evoluíram e adaptaram-se a vários habitats (MAGALHÃES JR. et al., 2004).

As principais características morfológicas do gênero *Oryza* são a presença de glumas estéreis rudimentares, espiguetas bissexuais, folhas estreitas, herbáceas

com nervuras lineares e bordos serrilhados (VAUGHAN; MORISHIMA; KADOWAKI, 2003). Botanicamente, este gênero se caracteriza por apresentar espiguetas conectadas à ráquila e por conter uma única flor terminal fértil, composta de duas glumelas florais (pálea e lema), seis estames, um estigma bifido e duas glumelas estéreis localizadas na base da flor (PEREIRA, 2002).

Este gênero é atualmente composto por 23 espécies (VAUGHAN, 1994), sendo que, duas espécies são cultivadas e vinte e uma são selvagens (KHUSH, 1997). As duas espécies cultivadas de arroz são *O. sativa* L. e *O. glaberrima* Steud., sendo a primeira originária na Ásia e a segunda circunscrita à África Ocidental (GRIST, 1975). As espécies silvestres mostram-se distribuídas por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo que dez espécies são encontradas na Ásia, cinco na África, duas na Austrália e quatro na América (MORISHIMA; MARTINS, 1994 apud ROSA; SANTOS; VEASEY, 2006).

No Brasil, foi constatada a presença de quatro espécies de arroz silvestre, *O. glumaepatula*, *O. alta*, *O. grandiglumis* e *O. latifolia* (SILVA et al., 2007). Essas espécies vivem em condições muito diferentes em relação às espécies cultiváveis, sendo passíveis de utilização em estudos de melhoramento genético do arroz cultivado, uma vez que estão adaptadas aos mais variados ambientes e, dessa forma desenvolvem constantemente resistências às pragas, a seca, às inundações e às doenças que causam danos às culturas afins (SILVA et al., 2007). Além disso, a abundante produção de biomassa por essas plantas em ambientes oligotróficos indica que as mesmas são capazes de estabelecer associações simbióticas com micro-organismos que auxiliam no seu estabelecimento e desenvolvimento.

Entretanto, pouco se conhece sobre as espécies silvestres, principalmente aquelas nativas da América do Sul. Os poucos estudos realizados com espécies sul-americanas utilizaram um número limitado de acessos, restritos geograficamente à região de Manaus, na Amazônia e recentemente, também foram realizadas expedições por uma grande extensão de rios da Amazônia e do Pantanal Matogrossense, os quais coletaram amostras populacionais de espécies silvestres de arroz nativas do Brasil (RANGEL et al., 2006).

1.2 *Oryza glumaepatula* Steud.

Vulgarmente conhecido como arroz flutuante, *O. glumaepatula*, é uma planta aquática emergente, perene ou anual, apresenta hábito de crescimento em forma de touceiras, com panículas abertas, espiguetas com cerca de 6,6 a 11 mm de comprimento e 1,9 a 2,5 cm de largura, aristas com 6 a 16 cm de comprimento e anteras que variam de 2 a 5 mm de comprimento ocupando $\frac{3}{4}$ da espiguetas (RANGEL, 1998 apud SILVA et al., 2007).

O. glumaepatula frutifica no período de fevereiro a agosto, vive usualmente em ambientes alagados e simultaneamente à elevação do nível da água dos rios há um rápido alongamento dos seus entrenós, podendo a atingir uma altura de 7 metros (RANGEL et al., 2006).

Essa espécie vegetal é amplamente distribuída na Amazônia, principalmente em áreas de várzea. Em Roraima, foi registrada a presença dessa espécie nos municípios de Boa Vista, Bonfim, Alto Alegre, Caracaraí e Normandia, sendo encontradas habitando áreas de várzea do Bioma savana e áreas de campinaranas do Parque Nacional do Viruá (RANGEL et al., 2006). Essas áreas abrigam ambientes de variadas características como campos, savana, florestas densas e abertas, com predomínio de vegetação herbácea e forte presença de buritis. Além disso, em sua maior parte, essas áreas são compostas por uma superfície praticamente plana, com predomínio de solos arenosos, e grande quantidade de lagoas (RANGEL et al., 2006).

O. glumaepatula se destaca entre as espécies silvestres existentes no Brasil, por pertencer ao pool gênico primário, as quais são diplóides com $2n=24$ cromossomos e possuidoras de genoma dominante (AA), o que facilita a obtenção de híbridos férteis, e sua utilização em estudos de melhoramento genético do arroz (KHUSH, 1997).

Em Roraima, o cruzamento interespecífico entre *Oryza sativa* (cultivar CICA-8) e *O. glumaepatula* (Linhagem RS-16) favoreceu a obtenção de 32 genótipos com características agrônômicas de interesse e com potenciais a serem utilizados em programas de melhoramento genético, visando a ampliação da base genética das espécies de arroz cultivadas (CORDEIRO; MEDEIROS, 2010).

1.3 Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são micro-organismos que colonizam o interior dos tecidos vegetais, incluindo raízes, caules, folhas e sementes onde desempenham diferentes funções sem causar efeitos negativos (STROBEL; DAYSE, 2003; SCHULZ; BOYLE, 2005). Eles foram mencionados pela primeira vez no início século XIX, mas foi somente nos anos 70 que adquiriram importância quando foi verificado que são capazes de produzir metabólitos secundários, os quais podem apresentar importantes atividades biológicas, como neurotóxicas, toxicoses, antimicrobianas, citotóxicas, antifúngicas, antibacterianas, inseticidas, hormônio de crescimento, dentre outros (SURYANARAYANA; KUMARESAN; JHONSON, 1998).

As estimativas de diversidade de fungos endofíticos giram em torno de um milhão de espécies, o que corresponde a quatro espécies de endófitos para cada uma das 250.000 espécies de plantas existentes (RODRIGUES, 2010). Eles podem ser encontrados colonizando todos os órgãos da planta hospedeira (PETRINI et al., 1992), sendo que sua presença é mediada por certo grau de especificidade e está relacionada às condições fisiológicas do hospedeiro (SELOSSE; TACON, 1998). A infecção dos hospedeiros pelos endofíticos pode acontecer por meio de fissuras, estômatos, hidatódios e apressórios e a colonização pode ocorrer nos espaços intercelulares, abaixo das células da epiderme (AZEVEDO, 1998; STROBEL; DAYSE, 2003).

Os principais grupos descritos de fungos endofíticos são compostos por representantes dos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Glomeromycota* (HUANG et al., 2001 apud RODRIGUES, 2010) e por vários gêneros como: *Arthobotrys*, *Dentrophora*, *Diatrypelia*, *Oudemansiella*, *Mucor* e *Phlebiopsis*, *Botryosphaeria*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Microdochium* e *Phoma*, *Bipolaris*, *Petriella*, *Phanerochaete*, *Collethotrichum* e seu anamorfo *Glomerella* e *Fusarium*, *Neotyphodium*, *Epicoccum*, *Lophodermium*, *Rhabdocline*, *Meria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cylindrocladium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Arthrinium*, *Beauveria*, *Cercospora*, *Cochliobolus*, Diaporthales, *Xylaria*, *Ramichloridium*, Pleosporales, *Phialocephala*, *Leptodontidium*, *Harpophora* e *Chloridium* (ALMEIDA ; YARA; ALMEIDA, 2005 ; YUAN, et al., 2011).

1.4 Interação planta - fungos endofíticos

Tem-se verificado ao longo de duas décadas de pesquisas com fungos endofíticos, que o comportamento desses micro-organismos, além de muito complexo, envolve interações muito variadas que são influenciadas pelas condições bióticas e abióticas do ambiente (AZEVEDO, 1998). Dessa forma, dentro da ampla variedade de espécies de fungos que se comportam como endofíticos, é possível existirem agrupamentos fúngicos de acordo com a natureza da relação que mantém com seu hospedeiro (COSTA NETO, 2002).

Algumas espécies caracterizadas como endofíticas podem se comportar como patógenos latentes, ou seja, estes infectam a planta, mas não desencadeiam sintomas de patogenicidade em seu hospedeiro (AGRIOS, 1988). Este tipo de relação tem sido considerado como uma relação endofítica temporária (GAMBOA; BAYMAN, 2001). Em alguns trabalhos realizados *in vitro*, após a reinoculação de fungos, como *Deightonella torulosa*, obtidos de tecidos assintomáticos de bananeira, observa-se sintomas de doenças (PHOTITA et al., 2004), comprovando-se que certas espécies endofíticas podem apresentar comportamento patogênico (MOSTERT; CROUS; PETRINI, 2000). Da mesma forma, espécies endofíticas que usualmente apresentam comportamento fitopatogênico, também podem se comportar como endofíticos, não desencadeando sintomas de doenças (RIVERA-VARAS et al., 2007).

Em geral, a espécie fúngica *Fusarium moniliforme* é responsável por causar podridão de raízes e de talos em plântulas de milho, além de produzir algumas toxinas (RHEEDER et al., 1992; BACON; HINTON, 1996). Entretanto, quando esse fungo interage com plantas de milho, em ecossistemas temperados e tropicais sua presença é mais comum como endofítico do que como patógeno (KEDERA; LESLIE; LAFLIN, 1994; GAMBOA; BAYMAN, 2001). Como exemplo, em estudo realizado na Nigéria, em tecidos de raízes e de folhas de milho as infecções eram assintomáticas, ou seja, o fungo apresentava comportamento endofítico não desencadeando sintomas de doenças (THOMAS; BUDDENHAGEN, 1980 apud MARQUEZ 2009).

Bacon e Hinton (1996) relatam que em geral as infecções assintomáticas que ocorrem em raízes, o crescimento de hifas pode ser observado nos espaços intercelulares das células, diferentemente do que acontece quando as infecções

resultam em doenças, uma vez que a produção de toxinas pelos fungos alteram a integridade da estrutura celular do hospedeiro, fazendo com que haja o crescimento das hifas intracelularmente. No entanto, Esse fato pode ser decorrente da influência dos fatores ambientais como umidade, temperatura, níveis de precipitação e por alterações na fisiologia do hospedeiro (PHOTITA et al., 2004).

Existem ainda algumas situações em que espécies endofíticas podem se comportar como saprófitos latentes, ou seja, fungos infectam assintomaticamente as plantas, e quando essas plantas senescem ou morrem, os fungos endofíticos colonizam seus tecidos, produzem estruturas reprodutivas e completam seu ciclo de vida (PROMPUTTHA et al., 2007).

Por último, existem ainda as interações em que fungos endofíticos podem se comportar como simbiote mutualístico, sendo capazes de proporcionar uma variedade de vantagens às plantas em condições de estresses seja de natureza biótica ou abiótica (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008).

Redman e colaboradores (2002) verificaram que a gramínea *Dichantelium lanuginosum*, encontrada em solos que chegam a aproximadamente 50°C, só consegue crescer nessas condições devido à associação com *Curvularia protuberata*, endófito radicular que proporciona proteção térmica ao vegetal devido à presença de células melanizadas que contribuem para a dissipação do calor ao longo das hifas.

Em outros casos, tem sido sugerido que fungos endofíticos podem induzir alterações fisiológicas no hospedeiro capacitando-as à sobrevivência em condições de estresse hídrico ou salino (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001). O estresse salino em plantas de cevada gerado pela aplicação de 100 mM de NaCl, foi completamente contornado quando estas eram inoculadas com o fungo endofítico *Piriformospora indica* (WALLER et al., 2005). Os mecanismos associados a esses processos podem estar baseados na diminuição da transpiração, eficiência no uso da água, aumento na produção de substâncias orgânicas como osmólitos e controle estomático (RUIZ-LOZANO et al., 2001). Estes autores sugerem ainda que tais efeitos podem estar associados a melhoria nutricional da planta, fazendo com que consigam se adaptar as variadas condições ambientais.

Adicionalmente, em gramíneas, como *Festuca* sp. a presença do fungo endofítico *Neotyphodium uncinatum* tem sido sugerida como benéfica, uma vez que confere proteção contra herbivoria (BREEN, 1994). Também em *Lolium perenne*,

infectada pelo fungo endofítico *Acremonium* sp. tem sido verificado resistência ao pulgão *Schizaphis graminum* (RIVERA-VARAS et al., 2007). Essa resistência pode estar relacionada à diminuição da palatabilidade dos hospedeiros ou então à produção de toxinas e de substâncias antibióticas que inibem os patógenos (MÁRQUEZ, 2009).

Interações entre fungos endofíticos também tem sido relatadas, inclusive ocorrendo parasitismo entre os parceiros. Rivera-Varas e colaboradores (2007) verificaram a presença de atividade antagônica entre o fungo endofítico *Acremonium strictum*, isolado de batata infectada por sarna prateada, e o fungo patogênico *Helminthosporium solani* em condições de laboratório. Esse estudo demonstrou que *A. strictum* é um microparasita capaz de reduzir significativamente a esporulação, a germinação dos esporos e o crescimento micelial da espécie patogênica.

1.5 Fungos Endofíticos Dark Septate (DSEF)

Fungos endofíticos do tipo dark septate (DSEF) são um grupo de fungos endofíticos filogeneticamente diverso e pertencem à classe Ascomycetes. Eles são caracterizados por apresentarem pigmentação escura intensa e por não esporular em meio artificial (GRÜNIG et al., 2002; SIEBER, 2002 apud YUAN et al, 2010).

Os DSEF são fungos septados estéreis ou conidiais, formam estruturas melanizadas como hifas inter e intracelulares e microescleródios nas raízes das plantas. Eles são reportados como colonizadores de aproximadamente 600 espécies de plantas, tendo sido isolados de plantas não colonizadas por fungos micorrízicos e de plantas que formam simbiose micorrízica, do tipo arbuscular, ericóide, orquidóide e associações ectomicorrízicas (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; ADDY; HAMBLETON; CURRAH, 2000).

Phialophora sp. e *Phialocephala* sp. parecem constituir o principal subgrupo de DSEF, onde espécies do gênero *Phialophora* são encontradas vivendo usualmente em raízes de plantas herbáceas, especialmente gramíneas enquanto o gênero *Phialocephala* sp. é encontrado colonizando espécies vegetais pertencentes aos gêneros *Betula*, *Pinus*, *Picea*, *Carex*, *Abies* dentre outros (SIEBER, 2002 apud YUAN et al., 2010). No entanto, outras espécies fúngicas pertencentes a diferentes gêneros, como: *Cadophora finlandica*, *Cryptosporiopsis rhizophila*, *Exophiala* sp,

Heteroconium chaetospira, *Leptodontidium orchidicola*, *Oidiodendron maius*, *Phialocephala dimorphospora*, *Phialocephala sphaeroides*, *Phialophora graminicola*, *Rhizoscyphus ericae* (anamorfo de *Scytalidium vaccinii*), *Trichocladium opacum* e *Chloridium paucisporum* têm sido descritas como espécies de DSEF (ADDY; PIERCEY; CURRAH, 2005).

Os DSEF apresentam ubiquidade e são frequentemente encontrados em ambientes estressantes (MANDYAM; JUMPPONEN, 2005). A presença desses fungos pode ser observada em plantas oriundas dos mais variados ecossistemas como habitats árticos, antárticos, temperados, boreais e tropicais (MANDYAM; JUMPPONEN, 2005; SRAJ-KRZIC et al., 2006; MARINS; CARRENHO; THOMAZ, 2009; PEREIRA et al., 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre a abundância dos DSEF nos habitats boreais e tropicais.

O Brasil é reconhecido como um dos países detentores de uma grande biodiversidade, não só por sua grande extensão geográfica, diversidade ambiental, e inclusão de diversos biomas em sua extensão territorial, mas também por estar nos trópicos. Entretanto, até o momento os DSEF, somente foram estudados em espécies do cerrado de Minas Gerais, em macrófitas aquáticas presentes no Alto Rio Paraná e mais recentemente em plantas daninhas encontradas no Estado de Minas Gerais (DETMANN, 2007; MARINS; CARRENHO; THOMAZ, 2009; SANTOS et al., 2010). Havendo, portanto a necessidade de novos estudos, a fim de elucidar a presença desses micro-organismos nos ecossistemas brasileiros, dada a ampla biodiversidade encontrada nesses ambientes.

A coexistência de DSEF e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) tem sido relatada em espécies de plantas medicinais, macrófitas aquáticas e espécies de plantas nativas do cerrado de Minas Gerais (DETMANN, 2007; MANDYAM, 2008; MARINS; CARRENHO; THOMAZ, 2009). Essa ocupação simultânea de DSEF e FMA pode indicar uma dinâmica própria da comunidade de fungos colonizadores de raízes, onde os DSEF parecem ter preferência por partes mais antigas do sistema radicular (LIVINGSTON; BLASCHKE, 1984 apud JUMPPONEN; TRAPPE, 1998). Além disso, tem sido observado que a aplicação de esterco de animais sobre pastagens favorecem a redução da colonização por FMA, mas aumenta significativamente a colonização por DSEF (CHRISTIE; KILPATRICK, 1992). Os autores associaram esse efeito a alterações na disponibilidade de nutrientes como, fósforo (P), cobre (Cu) e zinco (Zn), resultando na inibição da colonização de FMA.

Em trabalho realizado em 3 pântanos em Nova Iorque, Weishampel e Bedford (2006), avaliaram a presença de DSEF e FMA em comunidades de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas típicas dessas regiões. A colonização micorrízica arbuscular foi maior em dicotiledôneas do que em monocotiledôneas, sendo o percentual de colonização de 60% e 15%, respectivamente, enquanto a colonização por DSEF foi de 25% em monocotiledônea e de 10% em plantas dicotiledôneas. Os autores relatam de que essas diferenças podem ser decorrentes das condições ambientais como umidade, pH e disponibilidade de nutrientes.

A determinação da percentagem de colonização por FMA e DSEF também foi realizada em plantas hidrófitas de córregos e lagos no sudoeste da China (KAI; ZHIWEI, 2006). Trinta e duas espécies foram investigadas, sendo a taxa de colonização total por FMA de 25% e por DSEF de 23%, confirmando a habilidade desses organismos viverem em ambientes aquáticos. Além disso, os autores sugerem que a presença dos DSEF em ambientes aquáticos, pode ser um indicativo de funções ecológicas importantes, como por exemplo, a aquisição de nutrientes.

A presença de espécies de DSEF como *Phialocephala* spp., *P. dimorphospora* e *P. scopiformis* também tem sido observada tanto em partes vivas quanto em partes mortas de plantas de *Betula pendula* e *Pinus sylvestris* (MENKIS et al., 2004). Estes autores relatam que os DSEF apresentam ampla plasticidade ambiental, ocupando uma variedade de nichos ecológicos como raízes, caules lenhosos de aparências saudáveis e em decomposição, e superfícies recém-cortadas como galhos e troncos. A persistência do fungo nos tecidos vegetais mortos pode ser viabilizada pela presença de micélios extra-radulares capazes de colonizar diferentes tipos de substratos (MANDYAN, 2008).

As estratégias utilizadas para colonizar diferentes tipos de substratos, estão associadas à capacidade de produzir enzimas como amilase, lacases, pectinases, lipases, xilanase e enzimas proteolíticas, que estão envolvidas na hidrólise dos compostos orgânicos tanto em ambientes aquáticos, quanto em ambientes terrestres (MANDYAM, 2008).

A presença dos DSEF nas raízes de plantas da família Poaceae tem sido, frequentemente relatada (PORRAS-ALFARO et al., 2008), sendo a taxa de colonização altamente variável, dependente do hábitat, do hospedeiro e de flutuações sazonais (MANDYAM, 2008).

Em condições experimentais de campo no Centro Tecnológico de Pesquisas na China, onde a água é um fator limite para o desenvolvimento das plantas, mudas de três cultivares de *Lycium barbarum* foram plantadas isentas de fungos. Quatro anos após o plantio, essas plantas foram analisadas quanto à colonização por DSEF e observou-se altas taxas de colonização por hifas melanizadas (85%) e produção significativa de microescleródios (60%) nas raízes de todas as cultivares. Os autores associaram as altas de colonização aos papéis funcionais que esses fungos podem desempenhar nesse ambiente, que na maioria do tempo encontra-se seco, onde os DSEF poderiam estar propiciando resistência à seca (ZHANG et al., 2010).

Vários trabalhos caracterizaram e quantificaram a presença dos DSEF, mas, em geral, os trabalhos envolvendo os DSEF são escassos, sendo necessário estudos para avaliar a presença desses organismos nas raízes das plantas, na tentativa de elucidar quais são os fatores determinantes para o estabelecimento desse novo tipo de interação simbiótica.

1.6 Fungos endofíticos do tipo DSEF e efeitos sobre as plantas

A interação observada entre DSEF e a planta hospedeira tem sido relatada como semelhante à simbiose observada para fungos micorrízicos. A colonização por DSEF em plantas têm sido observada nos diversos ecossistemas estudados, evidenciando que eles desempenham, embora desconhecidos, importantes papéis na manutenção desses ecossistemas (MANDYAM, 2008).

Dentre as possíveis funções dos DSEF em ecossistemas naturais, é sugerido que eles sejam capazes de promover aumento da matéria seca, maior tolerância aos estresses de natureza biótica (pragas, doenças) e abiótica (seca, salinidade, tolerância ao calor etc.), e ainda podem desempenhar papel na dinâmica de comunidades (MANDYAM, 2008).

É sugerido ainda por diversos autores, que tais fungos podem atuar na absorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos (MANDYAN; JUMPPNEM, 2005), uma vez que semelhante aos fungos micorrízicos arbusculares, eles produzem hifas fúngicas extra-radulares que seriam capazes de explorar o solo, possibilitando maior absorção dos nutrientes necessários ao desenvolvimento e crescimento dos vegetais. Além do mais, tem sido relatado que os DSEF produzem uma variedade

de enzimas extracelulares, o que nos indica que apresentam potencial para acessar e transferir ao seu hospedeiro nutrientes essenciais como carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) (MANDYAN, 2008).

Trabalhando com co-cultura em meio Murashige-Skoog (MMS), Hou e Guo (2009), observaram efeito positivo em plântulas de *Dendrobium nobile*, quando inoculadas com um isolado de DSEF obtido a partir de raízes de *Dendrobium sp.* presentes em floresta subtropical. Tal efeito pode ser comprovado pelo aumento da altura da planta, do diâmetro do caule, do número de novas raízes e da biomassa vegetal quando comparado aos tratamentos controle. Resultado semelhante, foi observado por Wu; Guo (2008), em trabalho realizado com *Saussurea involucrata*, espécie de planta medicinal, inoculada com um isolado de DSEF, obtido a partir da mesma espécie (*S. involucrata*). As mudas inoculadas e cultivadas em frascos contendo vermiculita e serrapilheira na proporção de (10:1), suplementados com 12 mL de meio MS líquido, apresentaram aumento significativo na altura e na massa seca da parte aérea de 22,7% e 31,25%, respectivamente, em relação ao controle. Os autores relacionaram estes efeitos à produção de enzimas fúngicas que permitiram a utilização da matéria orgânica tornando disponíveis às plantas nutrientes importantes ao seu desenvolvimento ou até mesmo a produção de substâncias reguladoras de crescimento como o ácido indolacético.

Outros trabalhos sugerem a participação dos DSEF na transferência de nutrientes para o hospedeiro (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998). Um estudo realizado *in vitro* testou a utilização de 7 fontes de N, glicina, leucina, felanina, valina, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}$ por plantas de *Chinese cabbage* inoculadas com a espécie de DSEF, *Heteroconium chaetospira* em meio ágar basal (USUKI; NARISAWA, 2007). Os autores observaram que a inoculação promoveu a utilização de todas as fontes de aminoácidos e de nitrato de sódio (NaNO_3), sendo observados efeitos significativos no crescimento da planta. Os mecanismos para essa transferência de nutrientes podem ser semelhantes aos observados nas interações micorrízicas, onde as hifas fúngicas absorvem N orgânico, como aminoácidos e pequenos peptídeos, bem como N inorgânico do solo e transferem às plantas através da interface fungo-planta. No entanto, os autores relatam que isso ainda são suposições, sendo necessários novos estudos.

Em estudo realizado no México, a conectividade entre mosaicos de gramíneas colonizadas por DSEF, foi mensurada pelas taxas de N translocado

usando nitrogênio marcado com N^{15} -NO₃, $^{13}C_5$ e N^{15} – ácido glutâmico (GREEN; PORRAS-ALFARO; SINSABAUGH, 2008). Estes autores observaram que os mosaicos de gramíneas foram capazes de translocar fontes de N orgânico e inorgânico por aproximadamente 1m², sendo a taxa de translocação de ácido glutâmico maior do que a de nitrato, 13% e 9%, respectivamente. Os mecanismos de transferência de nutrientes pelos DSEF não são totalmente compreendidos, mas como havia abundância de N inorgânico e orgânico nas gramíneas e pouca colonização por FMA, os DSEF foram sugeridos como o principal agente biológico envolvido nessa transferência.

Jumpponen; Mattson e Trappe (1998) avaliaram a absorção de nutrientes por *Pinus contorta* inoculado com *Phialocephala fortinii*, espécie de DSEF isolada de solo contendo a combinação de uréia e matéria orgânica. A inoculação com este endófito não apenas aumentou o crescimento da planta, mas também favoreceu significativamente a absorção de P pelo vegetal. A combinação de N, matéria orgânica e a inoculação fúngica levou ao aumento da biomassa da parte aérea e do sistema radicular do hospedeiro em mais de 50% e 40%, respectivamente, em relação ao tratamento controle. Estes autores especularam que o aumento na absorção de P e de N combinado com a inoculação permitiu que *P. fortinii* exibisse comportamento semelhante ao micorrízico, uma vez que visualizou-se estruturas fúngicas intracelulares análogas aos arbúsculos ou enovelados de hifas formadas em micorrizas ericóides, sendo razoável supor que através dessas estruturas o fungo conseguiria obter fotossintatos do hospedeiro.

A inoculação de plântulas da gramínea *Vulpia ciliata* com *Phialophora graminicola* também resultou em aumento significativo no diâmetro do caule, número de novas raízes e no conteúdo de P total, os quais foram 33%, 78% e 43%, respectivamente, em comparação às plântulas controle (NEWSHAM, 1999). A inoculação da planta com essa espécie de DSEF também foi correlacionada com o aumento de 80% no conteúdo de N do sistema radicular, uma vez que as plantas produziram maior número de pelos radiculares, fato não observado em plantas não inoculadas.

Um dos mecanismos que parece ter correlação direta com os mecanismos de nutrição das plantas advindas da inoculação com DSEF, é a solubilização de fontes de P. Em estudo realizado em condições de casa de vegetação, ao inocular *Aspergillus ustus* em *Atriplex canescens* plantada em substrato contendo areia

verificou-se que o fungo foi capaz de hidrolisar uma fonte de P indisponível, o fosfato de rocha tricálcico (BARROW; OSUNA 2002). A nutrição melhorada derivada da fonte de P recalcitrante resultou em uma resposta típica micorrízica, favorecendo o aumento da biomassa da parte aérea e da raiz (BARROW; OSUNA 2002).

Os DSEF são ainda relacionados à maior tolerância a seca e ao calor. A presença quase exclusiva desses fungos em plantas nativas do semi-árido do Novo México, tem sido sugerida como auxílio na sobrevivência em condições de seca, uma vez que a presença de hifas melanizadas e da mucilagem que se estende ao longo das raízes, facilitaria o transporte de água em condições de seca prolongada (BARROW, 2003). A presença de hifas melanizadas pode favorecer a dissipação de calor ou a formação de complexos com radicais de oxigênio durante o estresse, podendo os DSEF desempenhar funções essenciais para o crescimento e sobrevivência de plantas nesses ambientes em particular (JUMPPONEN; TRAPPE 1998).

No entanto, apesar de existirem vários exemplos apoiando as possíveis funções realizadas pelos DSEF em diversas espécies vegetais e nos mais variados ambientes, faltam estudos realizados sob condições de campo que levem em consideração todas as particularidades bióticas e abióticas, e que consigam explicar quais são os mecanismos responsáveis pelos efeitos positivos advindos do estabelecimento desse tipo de interação simbiótica entre planta hospedeira e fungo.

1.7 Estudos moleculares com os DSEF

Os DSEF representam um grupo de fungos que podem estar sobrepostos a outros grupos, ou então, podem estar sendo recrutados a desempenhar novas funções, havendo dessa forma complexos e ricos consórcios de fungos endofíticos (MENKIS et al., 2004). A utilização de técnicas moleculares, baseadas em análises de sequências de DNA ribossômico das regiões ITS (Inter transcribed space), tem sido amplamente utilizada, na tentativa de elucidar várias questões sobre esses micro-organismos.

Em trabalho realizado por Yuan et al. (2010), a amplificação do rDNA da região ITS de 58 isolados obtidos a partir de raízes de arroz silvestre *Oryza granulata*, foi feita através do uso dos iniciadores ITS1 (5' -

TCCGTAGGTGAACCTGCGG - '3) e ITS4 (5' –TCCTCCGCTTAT TGATATGC - '3) Após o sequenciamento das regiões amplificadas e comparação com as sequências depositadas no National Center for Biotechnology information (NCBI), verificou-se que 31 isolados apresentaram 99% de similaridade com várias linhagens de ascomicetos, sendo representadas por pelo menos sete ordens (Hypocreales, Diaporthales, Eurotiales, Xylariales, Microascales, Capnodiales e Magnaporthales). As sequências de 9 genótipos não se assemelharam a nenhuma sequência depositada no NCBI, mas a filogenia molecular atribuiu todos os 9 isolados à classe Dothideomycetes pertencente ao filo Ascomycota. Dezoito sequências não puderam ser atribuídas a nenhum gênero ou espécie, pois suas sequências não se assemelharam às sequências de nenhuma espécie descrita e depositada no banco de dados. Possivelmente esses fungos são um importante fator de adaptação do arroz silvestre em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes, indicando serem potenciais recursos biológicos a serem explorados em estudos envolvendo espécies de arroz cultivado.

A presença de uma nova espécie de DSEF, *Harpophora oryzae* também foi descrita por Yuan et al., (2010). Os autores relatam que a habilidade das espécies silvestres ocuparem nichos ecológicos de variações distintas, faz com que tais plantas sejam reservatórios de uma diversidade única de fungos, sendo sugerido que alguns taxa de fungos sejam colonizadores de hospedeiros específicos, tendo eles co-evoluídos.

Em espécies cultivadas de arroz como *O. sativa*, a presença de fungos endofíticos também foi verificada (NAIK; SHASHIKALA; KRISHNAMURTHY, 2009). No entanto, o número de isolados fúngicos relatados é inferior ao número de isolados obtidos da espécie silvestre *O. granulata*. Além do mais, nenhuma espécie de DSEF nova foi isolada do arroz cultivado até o momento, indicando que espécies silvestres abrigam mais e, ou novos fungos endofíticos do que as espécies cultivadas (YUAN et al., 2010).

Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) do isolado DEF-17, obtido de raízes de *D. nobile*, revelou que esta espécie de DSEF apresenta 96% de similaridade com sequências de DNA de espécies do gênero *Leptodontidium* (HOU; GUO, 2009). Este gênero compreende espécies características de fungos micorrízicos, levando a associar essas semelhanças

filogenéticas aos papéis funcionais dos DSEF a qual tem sido sugerido e demonstrando na literatura.

A análise de sequências da regiões ITS1-5.8S-ITS2 (470–520 bp) de 127 isolados de DSEF obtidos de raízes e de caules vivos e mortos de plantas de *Betula pendula* e *Pinus sylvestris* também foi realizada (MENKIS et al., 2004). As comparações das sequências obtidas com as sequências depositadas no GenBank mostraram que todos os isolados apresentaram homologia de 95-100% com espécies *Phialocephala* sp.

No entanto, apesar de nos últimos anos a utilização de ferramentas moleculares terem ajudado na identificação desses fungos, poucas são as espécies descritas. Em geral faltam informações sobre esses fungos em bases internacionais de dados (MENKIS, et al., 2004). O desenvolvimento de novas técnicas moleculares para a avaliação da diversidade dos DSEF aliado à taxonomia morfológica auxiliará na melhor compreensão da taxonomia desse grupo fúngico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar fungos endofíticos do tipo dark septate isolados de raízes de arroz silvestre, em áreas de mata e de savana do Estado de Roraima.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o isolamento dos DSEF;
- Verificar a presença das estruturas características dos DSEF;
- Determinar a percentagem de colonização por dark septate em raízes de arroz silvestre;
- Constatar a colonização de isolados de DSEF em arroz silvestre, *O. glumaepatula*;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de isolados de DSEF colonizarem raízes de plantas de *O. sativa*;
- Identificar os isolados de DSEF obtidos de arroz silvestre em nível de gênero ou de espécie a partir do sequenciamento da região ITS1- 5.8S-ITS2 dos genes ribossomais dos DSEF;
- Avaliar *in vivo* a capacidade de alguns isolados de DSEF em promover o crescimento vegetal de *O. sativa* através da utilização de diferentes concentrações de fósforo (P) e de nitrogênio (N) presentes em 4 diferentes tipos de substratos.
- Preservar todos os isolados com características de DSEF em água destilada estéril e água destilada estéril adicionada com glicerol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de solo e plantas

Foram realizadas duas coletas de plantas de *O. glumaepatula*, entre os meses de setembro de 2009 e março de 2010: a primeira foi realizada em área de savana, no Município de Bonfim, RR (02° 58' N, 60° 21' W); e a segunda, nas proximidades de uma área de mata no Parque Nacional do Viruá, Caracaraí, RR (01° 24' N, W 60° 59' W) (figura 1). Essas áreas são caracterizadas por possuírem variedades de ambientes como campos, savana, florestas densas e abertas, com predomínio de vegetação herbácea e forte presença de buritis. Além disso, em sua maior parte, essas áreas são compostas por uma superfície praticamente plana, com predomínio de solos arenosos, e grande quantidade de lagoas (RANGEL et al., 2006). Em áreas de savana, foram coletadas plantas em estágio reprodutivo, em locais alagados e secos. Em cada um dos locais, foram coletadas três touceiras, em três pontos distintos, no 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, no total de seis amostras compostas. Touceiras de arroz e solo retirado do mesmo ponto de coleta das plantas foram acomodadas em sacos plásticos e transportadas até o Laboratório de Microbiologia da Embrapa Roraima. Após as coletas, uma parte das amostras de raízes foi processada visando o isolamento dos “dark septate” (DSEF) e outra parte foi fixada em FAA (formol, ácido acético e álcool na proporção de 2:1:1), visando à otimização do protocolo de descoloração e coloração para a determinação da percentagem de colonização dos DSEF, descrito no item 3.3.

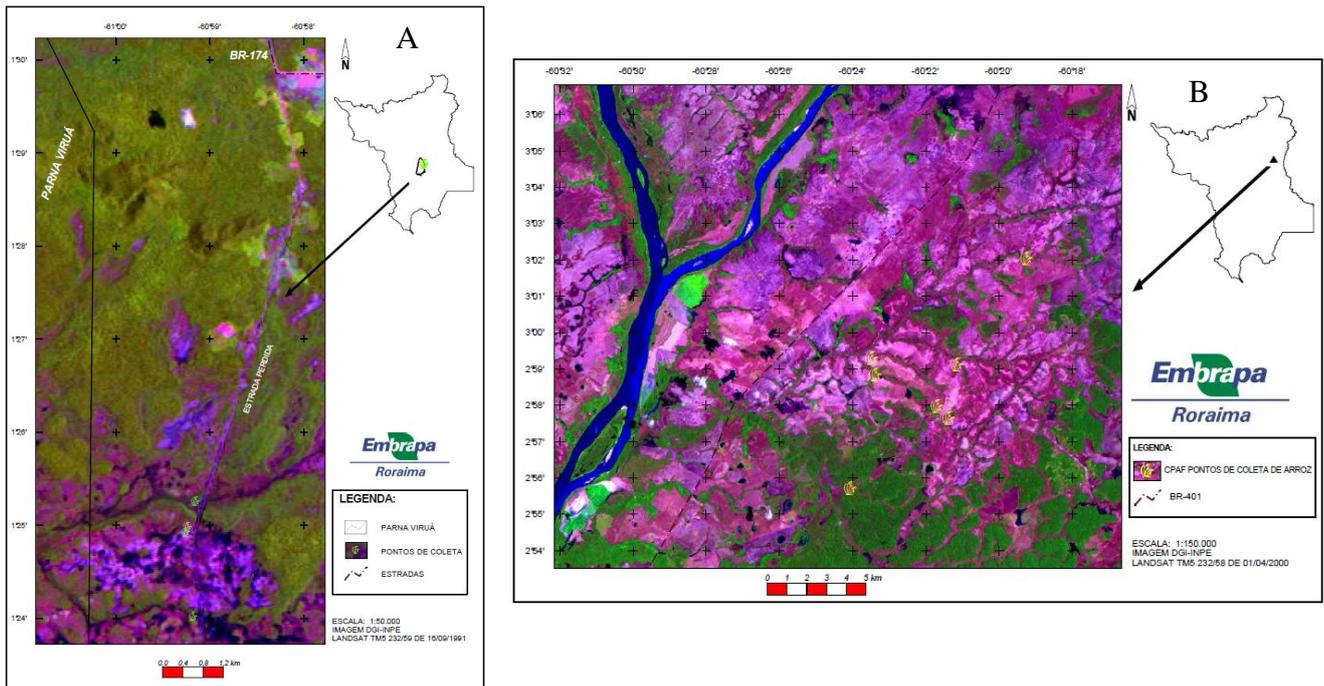


Figura 1: Mapas com os locais de coleta de solo e de plantas de *O. glumaepatula*. (A) Parque Nacional do Viruá e (B) Área de savana.

Fonte: Carlos Moura

3.2 Isolamento e preservação de fungos endofíticos dark septate (DSEF)

Para o isolamento dos DSEF, as raízes do arroz foram previamente lavadas em água potável, seccionadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm e desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% e peróxido de hidrogênio a 33% por 2 e 1 min, 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 uma nova placa contendo meio ágar-malte e incubadas 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 . Todos os isolados fúngicos melanizados e septados foram depositados na coleção de fungos do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa-Roraima.

3.3 Observação das características e determinação da percentagem de colonização radicular por DSEF

Para a observação das estruturas características de DSEF, as raízes mantidas em FAA foram diafanizadas por imersão em solução de KOH à temperatura ambiente por aproximadamente 50 minutos. Após este processo, as raízes foram neutralizadas utilizando solução de HCl a 2% por 5 min 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, 1991).

A determinação da percentagem de colonização por DSEF foi realizada pelo método da contagem em lâmina (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980), onde 40 segmentos de raízes por planta de aproximadamente 1 cm foram selecionados ao acaso e organizados paralelamente em uma lâmina de microscópio quadriculada ($0,5 \times 0,5 \text{ cm}$), 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.

3.4 Inoculação dos isolados de DSEF sobre o hospedeiro original *O. glumaepatula*

De posse dos isolados fúngicos de DSEF conduziu-se um ensaio em câmara de crescimento para avaliar a capacidade dos isolados de DSEF colonizarem o

sistema radicular do arroz silvestre. Placas de petri receberam 60 mL de meio esterilizado contendo solução de Hoagland ½ força (HOAGLAND; ARNON, 1950) e ágar 9 g L⁻¹. As sementes de arroz tiveram a casca removida manualmente, foram desinfestadas superficialmente pela imersão em álcool 70%, hipoclorito de sódio (2,5%), e peróxido de hidrogênio (10%) e lavadas com água destilada estéril por 5 vezes. Após esse processo, as sementes foram então pré-germinadas em ágar-água (9 g L⁻¹). Ao final de 4 dias, quando as sementes já haviam germinado, três plântulas de arroz foram transferidas para placas de petri contendo solução de Hoagland ½ força, sendo adicionados posteriormente dois discos de ágar malte contendo o micélio fúngico. Todas as placas foram vedadas com parafilme, acondicionadas verticalmente em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, com temperatura e umidade relativa do ar variando de 25 a 28 °C e 60-70%, respectivamente. Ao final de 30 dias avaliou-se o comportamento de todos os isolados quanto aos sintomas de patogenicidade ou não.

3.5 Inoculação *in vitro* dos isolados de DSEF em arroz comercial *O. sativa*

Cinco dos isolados reinoculados em arroz silvestre e que apresentavam características distintas entre - si foram selecionados ao acaso e avaliados quanto à capacidade de colonizar o arroz comercial *O. sativa* (cultivar BRS sertaneja). Os vasos para o plantio foram confeccionados a partir de garrafas de vidro e receberam 300 mL de meio esterilizado contendo solução de Hoagland ½ força (HOAGLAND; ARNON, 1950) e ágar 9 g L⁻¹. Tanto a desinfestação como a germinação e a inoculação seguiram os mesmos procedimentos realizados no experimento de reinoculação em arroz silvestre, descrito no item 3.4. Após 30 dias, as raízes foram coletadas, diafanizadas e coradas, para determinar a percentagem de colonização por DSEF, utilizando o método de intercessão em lâmina quadriculada.

3.6 Crescimento de *O. sativa* em casa de vegetação inoculado com DSEF

A partir do experimento *in vitro* com *O. sativa* selecionou-se 3 isolados que visualmente proporcionou melhor desenvolvimento para as plantas para serem

testados em casa de vegetação. A capacidade de utilização de fontes de P (superfosfato simples) e N (uréia) pelas plantas inoculadas com diferentes isolados de DSEF foi testada em 4 substratos (tabela 1). O primeiro substrato foi constituído de solo virgem coletado em área de savana, o segundo substrato foi composto de solo corrigido com calcário e com adubação de NPK com fontes recomendadas para a região (SMIDERLE; GIANLUPPI; GIANLUPPI, 2002), o terceiro substrato foi composto de solo corrigido com calcário e com NPK nas doses recomendadas e suplementado com mais $\frac{1}{3}$ da dose recomendada de NPK e o quarto substrato foi constituído de areia e vermiculita submetido a doses recomendadas de NPK acrescido de fosfato de alumínio ($AlPO_4$) (tabela 2).

Todos os substratos foram autoclavados (121°C; 60min; 1 ATM) 15 e 2 dias antes da instalação do experimento e cada vaso recebeu três kg de cada substrato. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com 5 repetições. Tanto a desinfestação, como a germinação das sementes seguiram os mesmos procedimentos realizados no experimento de reinoculação em arroz silvestre, descrito no item 3.4. Ao final de 4 dias, 10 plântulas de arroz foram transplantadas para os vasos contendo os diferentes tratamentos e após 4 dias de transplantadas nos vasos, cada plântula foi inoculada com 01 disco de ágar malte contendo o micélio fúngico crescido.

Após 30 dias de incubação em casa de vegetação, retirou-se de cada vaso uma planta para determinar a percentagem de colonização por DSEF, e após 60 dias foram avaliados os parâmetros de massa seca da parte aérea e sistema radicular, altura das plantas, e novamente foi determinada a percentagem de colonização por DSEF.

Tabela 1: Análise química dos substratos utilizados no experimento casa de vegetação

	pH	M.O	P	K	Ca	MG	H+Al	Al	CTC	S (SO4)	Cu	Fe	Zn	Mn	B
	CaCl2	Gdm3	resina	Mmolc dm-3					mg DM-3	DTPA			MG/dm ³	água quente	
Solo virgem	3,8	8	3	0,3	4	3	25	4	32	6	0,1	82	0,3	2,1	0,14
Solo corrigido	4,2	8	3	0,3	9	4	22	2	35	7	0,1	57	0,3	1,1	0,18
Areia/ vermiculita	6,6	3	4	0,5	4	15	9	0	29	6	0,1	8	0,7	5,2	0,16

Tabela 2: Relação e quantidade de nutrientes aplicados em cada vaso para corrigir o solo.

Correção do Solo	N (uréia) mg/vaso	P (Superfosfato simples) mg/vaso	K (cloreto de potássio) mg/vaso	Ca (cloreto de Ca hexahidratado) g/vaso	Mg (cloreto de Mg hexahidratado) g/vaso	Micronutrientes* mL
1	0	0	0	0	0	0
2	180	420	115	1,5	0,7	5
3	60	140	39	1,5	0,7	5
4	180	420	115	4,5	0	5

* H₃BO₃, CuSO₄.5H₂O, FeCl₃.6H₂O, C₆H₈O₇.H₂O, MnCl₂.4H₂O, ZnSO₄.7H₂O, Na₂Mo₄.2H₂O

1 Solo virgem

2 Solo corrigido (base recomendação) + NPK

3 Solo corrigido (base recomendação) + 1/3 da dose NPK

4 Areia e vermiculita; nutrientes igual solo corrigido, porém com a aplicação de AlPO₄

3.7 Extração do DNA genômico

A extração do DNA fúngico foi realizada utilizando-se o do Kit de extração Invisorb® Spin Plant Mini (Invitex) com adaptações. O micélio de cada isolado fúngico foi crescido em meio ágar-malte por aproximadamente 4 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%) e incubado a -20 °C por 24h (SCHWIGER; TEBBE, 1998). Após o período de incubação, o micélio fúngico foi completamente triturado com o auxílio de um pistilo laboratorial descartável e adicionou-se 40µL 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.

3.8 Caracterização genética

Para a análise genética, foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (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) (figura 2). 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 µmol 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 dos fragmentos amplificados foi realizado diretamente a partir do produto de PCR utilizando o iniciador ITS1 e ITS4, sendo a corrida realizada em sequenciador 3730xl.



Figura 2: Estrutura da região rRNA ITS1-5.8S-ITS2, indicando a posição dos oligonucleotídeos ITS1 e ITS4.

Fonte: White et al., 1990

3.9 Análise filogenética

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).

3.10 Análise estatística

Os dados paramétricos foram avaliados estatisticamente pelo programa Sisvar por meio de análise de variância através do teste *F* e a comparação de média pelo teste *t* de Student.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e preservação de fungos endofíticos “dark septate”

Após a incubação das amostras de raízes de *O. glumaepatula* em meio ágar-malte verificou-se que houve crescimento de colônias fúngicas 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 visualizadas 105 colônias fúngicas e praticamente não se verificou a presença de bactérias, o que mostra que a suplementação do meio ágar-malte com os antibióticos cloranfenicol, na concentração de 100 mg L⁻¹, e 240 mg L⁻¹ de sulfametoxazol mais trimetoprima 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 antagonistas 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 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 quanto a morfologia da colônia e através da análise microscópica de lâminas contendo o micélio fúngico. Foi possível observar que 46 isolados apresentaram micélio melanizado e hifas septadas com características morfológicas distintas entre si (figura 3), 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, 2009; RODRIGUES, 2010).

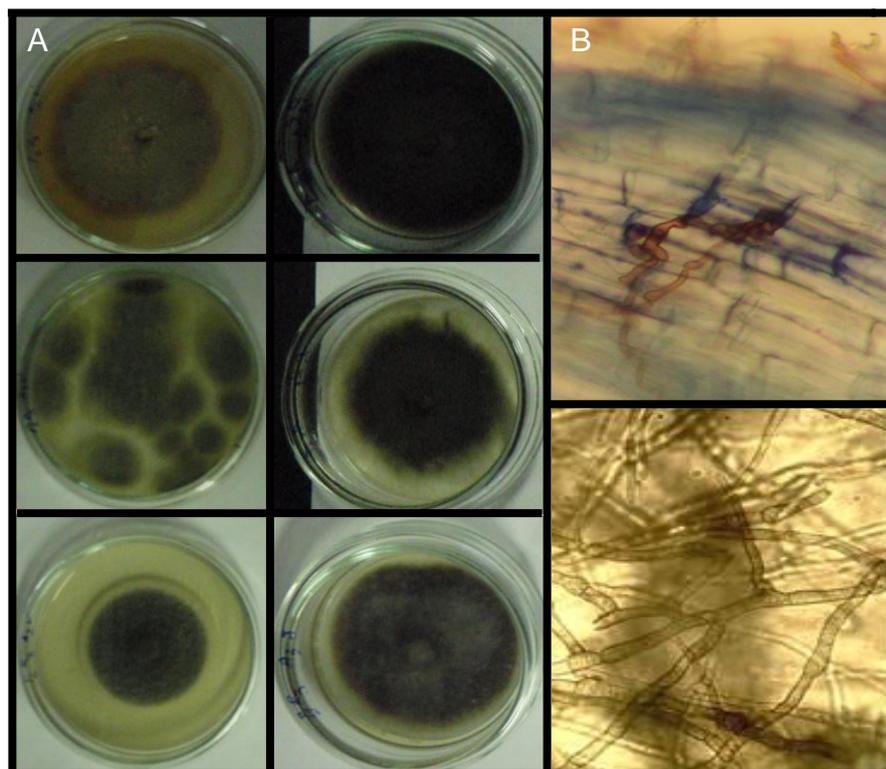


Figura 3: Morfologia de fungos endofíticos melanizados isolados de raízes de arroz silvestre *O. glumaepatula* cultivados em meio ágar malte a 28°C. (A) formação do micélio melanizado e septado; (B) hifas septadas e melanizadas e microscleródios no interior da raiz de *O. glumaepatula* (aumento de 400X).

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; LIRIO; LACAZ, 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).

4.2 Avaliação da colonização de DSEF em *O. glumaepatula*

Em todas as plantas de arroz silvestre coletadas em áreas de mata e de savana do estado de Roraima foi observada a presença de estruturas características de DSEF tais como, microscleródios e hifas melanizadas e septadas (figura 4). No

entanto houve diferença significativa na porcentagem de colonização por DSEF entre as plantas. A média de colonização por DSEF em plantas das áreas de mata e de savana foi de 16 e 7,7%, respectivamente (figura 5). 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 a área de savana (DETMANN, 2007).

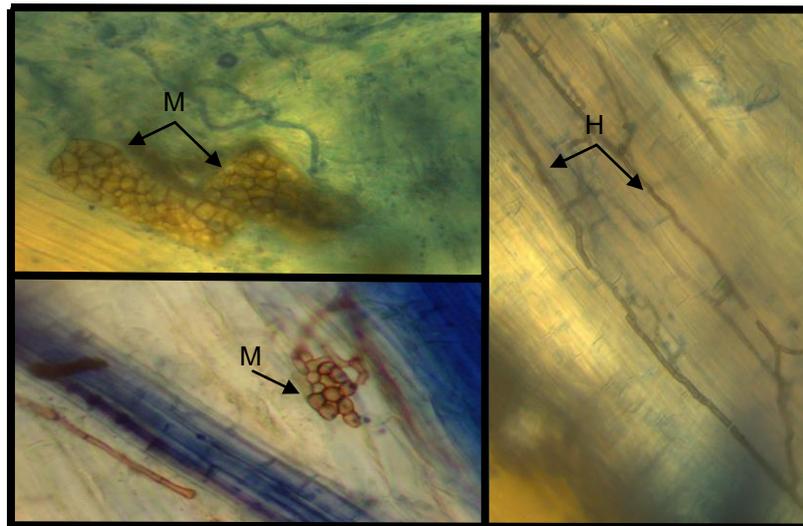


Figura 4: Estruturas de DSEF em raízes de arroz silvestre *O. glumaepatula*. Microescleródios (M) e Hifas melanizadas septadas (H) (aumento de 400X).

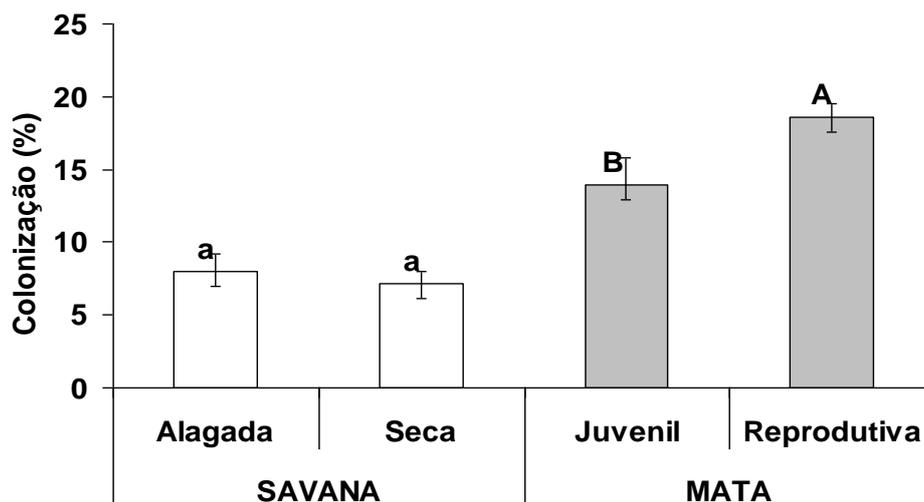


Figura 5: Percentagem de colonização por fungos endofíticos “dark septate” em plantas de *Oryza glumaepatula*, coletadas em áreas de savana – Alagada, local com solo alagado; Seca, local com solo seco – e de mata – Juvenil, plantas em estágio juvenil; Reprodutiva, plantas em estágio reprodutivo –, no Estado de Roraima. Barras seguidas de mesmas letras em um mesmo ambiente não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Bonferroni a 10% de probabilidade. As barras indicam o erro-padrão da média.

Na área de savana, a percentagem de colonização por DSEF foi igual nas plantas das áreas alagada e seca, o que indica que esses fungos são capazes de colonizar as plantas de *O. glumaepatula* em condições de alagamento (figura 5). 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; ANNA; ZHIWEI, 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; SANTOS; VEASEY, 2006). Na área de savana, 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.

A presença de colonização por hifas melanizadas (85%) e microescleródios (60%) em raízes de *Lycium barbarum*, mantidas em condições experimentais de campo por quatro anos foi relatada por Zhang et al., (2010). Estes autores enfatizaram que, apesar da investigação das estruturas formadas pelos DSEF nas raízes das plantas hospedeiras serem um fator importante para entender a relação existente com seus hospedeiros, estudos envolvendo esses micro-organismos são limitados, e muitas vezes deixados de fora das análises, não existindo dessa forma muitas informações sobre a percentagem de colonização desses fungos (AHLICH; SIEBER, 1996).

4.3 Inoculação *in vitro* de isolados de DSEF em *O. glumaepatula*

Após 30 dias de incubação em câmara de crescimento, avaliou-se o comportamento de cada isolado reinoculado no hospedeiro *O. glumaepatula*. Todos os isolados ocuparam abundantemente o meio de cultivo e colonizaram o córtex das raízes do arroz, formando hifas e microescleródios que são estruturas características dessa associação. Entretanto, 14 isolados apresentaram sintomas de patogenicidade e, na maioria das vezes as plantas inoculadas com estes isolados não sobreviveram ao período de incubação por 30 dias (tabela 3).

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).

Além do mais, de acordo com Francis e Read (1995) o comportamento dos DSEF parece semelhante aos efeitos observados em sistemas micorrízicos, uma vez que a dependência micorrízica pode variar entre as espécies hospedeiras. Estes autores relatam que espécies vegetais como a herbácea *Plantago lanceolata*, quando inoculada com espécies de fungos da classe dos Zygomycetes, estabelecem uma relação simbiótica mutualística, enquanto que a inoculação com espécies de fungos micorrízicos não pertencentes a essa classe, comprometem o crescimento e sobrevivência da planta. Dessa forma, supõe-se que semelhante ao que ocorre com fungos micorrízicos, a interação entre os fungos endofíticos e seus hospedeiros pode resultar em aumento, diminuição, ou nenhum efeito sobre o hospedeiro, como observado neste estudo.

Tabela 3: Comportamento de fungos isolados de áreas de mata do Parque Nacional do Viruá e de áreas de savana e seus efeitos em experimento de inoculação *in vitro* em arroz silvestre *O. glumaepatula*.

Isolados	Sintomas de patogenicidade
Não patogênico	
ERR01, ERR31, ERR02, ERR33, ERR03, ERR34, ERR04, ERR35, ERR05, ERR36, ERR07, ERR38, ERR08, ERR39, ERR09, ERR40, ERR16, ERR41, ERR17, ERR42, ERR18, ERR43, ERR25, ERR44, ERR26, ERR45, ERR27, ERR46, ERR28, ERR12, ERR29, ERR21	Não observados
Patogênico	
ERR14	Clorose
ERR19, ERR22, ERR23, ERR24, ERR30, ERR32, ERR37	Clorose e morte das plantas.
ERR10, ERR11, ERR15, ERR20, ERR06, ERR13	Clorose; crescimento do fungo na filosfera das plantas e morte das plantas.

As pesquisas com DSEF são relativamente recentes e têm mostrado que estes fungos representam um grupo bastante heterogêneo com ampla distribuição geográfica e funções ecológicas diversas, com papéis funcionais e ecológicos que coincidem com fungos saprófitas, simbióticos e patogênicos (JUMPPONEM; TRAPPE, 1998). Desta forma, é possível encontrar isolados fúngicos pertencentes a gêneros patogênicos em arroz silvestre que, quando inoculados em *Oryza sativa* não desencadeiam os sintomas de patogenicidade, havendo ainda a promoção do crescimento vegetal (YUAN et al., 2010).

O comportamento diferenciado desses fungos, em laboratório, indica que há uma grande diversidade de DSEF associados às plantas especialmente porque esses fungos apresentam elevado polimorfismo morfológico e molecular. 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. granula* na China (YUAN et al., 2010).

Dos quarenta e seis isolados avaliados em *O. glumaepatula*, cinco foram também testados em *O. sativa*. Nesta ocasião foi possível observar que a colonização das raízes por hifas variou de 20 a 60%, sendo de forma geral maior

para a espécie *O. sativa* (tabela 4). Por outro lado, a colonização por microescleródios variou de 1 a 30%, sendo que os diferentes isolados fúngicos não diferiram quanto a capacidade de colonização radicular das duas espécies de arroz, com exceção para o isolado ERR02 que apresentou maior presença de microescleródios na espécie *O. sativa* (tabela 4).

Tabela 4 - Percentagem de colonização das raízes de *Oryza glumaepatula* e *O. sativa* inoculadas com diferentes isolados de DSEF sob condições controladas.

Fungo	Hifas (%) ¹		Microescleródios (%) ¹	
	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. sativa</i>	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. sativa</i>
ERR01	39 BB	66 aA	27 AA	30 aA
ERR02	24 cB	52 bA	7 BB	22 bA
ERR03	47 AA	43 cA	4 BA	4 Ca
ERR04	31 bcA	38 cA	1 BA	3 Ca
ERR05	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

O isolado ERR01 apresentou maior 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 4). Em geral, estudos envolvendo fungos endofíticos que vivem em raízes de arroz silvestre, visam apenas a obtenção de isolados e sua caracterização morfológica (YUAN et al., 2010), não existindo, portanto, 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 radicular por DSEF que variou de 1- 49% (SATHIYADACH; MUTHUKUMAR, 2010), corroborando os dados observados nesse estudo.

4.4 Crescimento de *O. sativa* em casa de vegetação inoculado com DSEF

A partir da análise dos dados obtidos do experimento conduzido em casa de vegetação, verificou-se diferença entre os substratos para o parâmetro matéria seca

da parte aérea, sendo os substratos 2 e 4 os que proporcionaram os melhores rendimentos (tabela 5). Da mesma forma, para a matéria seca do sistema radicular, o substrato 04 apresentou produção inferior ao 2 e 3 e, igual ao 1, o qual representava um solo virgem com restrições de fertilidade do solo. Isso indica que embora o substrato tenha recebido os nutrientes de forma adequada houve restrição no desenvolvimento das raízes. Este efeito pode ser atribuído ao uso do fosfato de alumínio, pois sabidamente, o íon Al^{+3} apresenta toxidez ao sistema radicular e interfere na absorção, no transporte e na utilização de vários nutrientes como cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (MG) e nitrogênio (N) pela planta (PAVAN; BINGHAN, 1982). Além disso, na média geral dos substratos também se observou que no substrato 1 houve menor produção de matéria seca da parte aérea comparada ao substrato 2 e 4.

Quanto à inoculação, não se observou efeitos de patogenicidade sobre as plantas para nenhum dos fungos testados ao longo do período da condução do experimento. Por outro lado, em relação à colonização do sistema radicular, aos 30 dias observou-se apenas a presença pontual de hifas nas raízes e, aos 60 dias, quando o experimento foi coletado, a colonização estimada entre todos os isolados variou de 0,1% a 0,6%, não havendo, entretanto, diferenças expressivas entre os fungos (tabela 5).

Além disso, em cada substrato o efeito mais expressivo da presença dos fungos foi o incremento significativo da massa de matéria seca de raízes e total ocasionada pelo fungo ERR01 no substrato 2 e ERR01 e ERR04 no substrato 3 (tabela 5). Por outro lado, na média geral dos fungos, ERR01 e ERR04 apresentaram efeitos significativamente maiores para a massa de raízes e total, tendo o fungo ERR05 produzido menores incrementos em relação aos demais isolados (tabela 5).

Comparativamente aos experimentos iniciais realizados *in vitro* no qual a colonização chegou a ser superior a 60% (tabela 4), a colonização observada nas raízes das plantas em casa de vegetação foi muito baixa. Possivelmente, esta baixa colonização também tenha sido responsável pela não observação de efeitos mais contundentes quanto à contribuição dos fungos para o desenvolvimento das plantas de arroz.

Tabela 5 – Desempenho do arroz comercial *O. sativa* inoculado com diferentes isolados de DSEF sob condições de casa de vegetação.

Tratamentos	Massa de matéria seca por planta (MG)			Altura de plantas (cm)	Colonização de raízes (%)
	Parte aérea	Raiz	Total		
Média geral dos fungos ¹					
Controle	550 a	495 b	1046 BC	69 a	0,0
ERR01	653 a	611 a	1265 A	69 a	0,6
ERR04	600 a	638 a	1238 A	68 a	0,4
ERR05	522 a	480 b	1002 C	69 a	0,4
Média geral dos substratos ¹					
1	204 c	302 b	506 C	46 c	0,5
2	785 a	787 a	1572 A	73 b	0,4
3	546 b	793 a	1339 B	73 b	0,5
4	790 a	343 b	1133 B	83 a	0,3
Substrato 1 ¹					
Controle	144 a	255 a	399 A	46 a	0,0
ERR01	260 a	301 a	561 A	48 a	0,4
ERR04	217 a	333 a	551 A	47 a	0,6
ERR05	193 a	319 a	513 A	43 a	0,5
Substrato 2 ¹					
Controle	710 a	674 bc	1384 BC	69 a	0,0
ERR01	1022 a	1105 a	2128 A	73 a	0,6
ERR04	858 a	814 b	1672 B	76 a	0,3
ERR05	549 a	554 c	1103 C	73 a	0,5
Substrato 3 ¹					
Controle	486 a	670 b	1155 B	73 a	0,0
ERR01	595 a	750 b	1345 Ab	71 a	0,1
ERR04	638 a	1139 a	1777 A	74 a	0,6
ERR05	465 a	613 b	1078 B	75 a	0,4
Substrato 4 ¹					
Controle	862 a	383 a	1245 A	90 a	0,0
ERR01	736 a	289 a	1025 A	85 a	0,3
ERR04	684 a	266 a	950 A	74 b	0,2
ERR05	879 a	434 a	1313 A	84 a	0,5
C.V.(%)	35	31	30	10	

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, dentro de hifas ou microescleródios, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste *t* de Student. C.V.(%) igual a 11,4 para colonização por hifas e 34,9 para microescleródios.

A baixa colonização radicular das plantas pode ter sido em decorrência de fatores como o tempo de permanência do experimento (60 dias), uma vez que como observado neste trabalho, maiores taxas de colonização por DSEF foram observadas em plantas em estágio reprodutivo quando coletadas diretamente no ambiente. Isto indica que a colonização de DSEF em ambiente com características similares ao natural, pode ser coordenada por diferentes estágios de crescimento

das plantas (LIVINGSTON; BLASCHKE, 1984 apud JUMPPONEM; TRAPPE, 1998). Aliado a isso, a quantidade do inóculo inicial disponibilizada às plantas pode ter sido pequena, embora a mesma estratégia tenha apresentado sucesso em laboratório. Neste caso, a utilização de substrato com solo ou areia e vermiculita ao invés de meio de cultura pode ter conferido um ambiente em que o fungo encontrou maiores dificuldades para o desenvolvimento e infecção das raízes das plantas.

Outro fator que pode ter influenciado a colonização foi a quantidade de água disponibilizada para as plantas que pode ter sido em excesso, visto que em plantas coletadas em ambiente nativo neste trabalho foi verificada menor colonização nas plantas oriundas de áreas alagadas e/ou com solo úmido comparativamente ao solo seco, muito embora existam relatos da ocorrência desses fungos em ambientes aquáticos (MARINS; CARRENHO; THOMAZ, 2009). Alguns trabalhos relatam que a presença dos DSEF é influenciada por alterações na sazonalidade como umidade do solo e comprimento do dia (BARROW; AALTONEN, 2001; LINGFEI; ANNA; ZHIWEI, 2005), acarretando dessa forma baixas taxas de colonização.

Desta forma, a baixa colonização poder ser explicada sob várias possibilidades apresentadas acima, além de outras indicadas na literatura como pH, fonte de nitrogênio, exposição a luz solar e fonte de carbono (LV et al., 2010). O mais provável é que nesse experimento um conjunto de fatores adversos tenha contribuído para a colonização reduzida das plantas, dentre eles podemos citar a baixa quantidade de inóculo aplicado ao substrato autoclavado, o qual era pobre em matéria orgânica (tabela 1), o fornecimento de água e o tempo disponibilizado para que as plantas se desenvolvessem e fossem colonizadas pelos fungos.

Assim, outros estudos se fazem necessários para a elucidação dos fatores que têm influência na colonização do sistema radicular do arroz por DSEF, mas vale destacar que em estudo recente na China os autores observaram abundante colonização das raízes de arroz quando foi adicionada liteira ao meio de cultura, o que parece indicar a necessidade de uma fonte orgânica para que o fungo possa se multiplicar no ambiente (WU; GUO, 2008).

4.5 Identificação molecular dos Isolados de DSEF obtidos de *O. glumaepatula*

As sequências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 obtidas para cada um dos quarenta e seis isolados fúngicos foram submetidas à análise no BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) e observou-se que a maioria dos isolados fúngicos apresentaram similaridade com espécies de fungos pertencentes à pelo menos 11 gêneros (*Curvularia*, *Cochliobolus*, *Leptosphaeria*, *Perisporiopsis*, *Dokmaia*, *Phoma*, *Didymella*, *Cladosporium*, *Mycosphaerella*, *Phialophora*, *Phaeoacremonium*), além de outros isolados pertencentes à ordem Pleosporales, muito embora não tenha ocorrido o alinhamento com sequências de DSEF já descritas.

Os gêneros supracitados são comumente reportados por possuírem espécies fitopatogênicas (EL-MORSY, 2000; CROUS et al., 2009; APTROOT, 2006; MÁRQUEZ et al., 2010) e, também, saprófitos de solo e endofíticos (PETERSON; WAGG; PUTLER, 2008), o que mostra que os mesmos são ubíquos, apresentam habilidade na ocupação de nichos ecológicos diversos e são considerados endofíticos com múltiplos hospedeiros. Todos os fungos estudados apresentaram similaridade com ascomicetos, aos quais os DSEF já descritos pertencem (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998).

Semelhante resultado foi obtido em trabalho realizado por Yuan et al., (2010), com a espécie de arroz silvestre *O. granulata*, onde 31 isolados apresentaram similaridade de até 99% com linhagens de ascomicetos, representado por pelo menos sete ordens (Hypocreales, Diaporthales, Eurotiales, Xylariales, Microascales, Capnodiales e Magnaporthales). Além disso, várias sequências não se assemelharam a nenhuma sequência depositada no NCBI (National Center for Biotechnology information), o que levou a propor uma nova espécie de DSEF, *Harpophora oryzae*, indicando dessa forma, a existência de uma alta diversidade de fungos endofíticos associados ao arroz silvestre.

O fato de 46 isolados estarem distribuídos em vários gêneros mostra que a estratégia adotada para o isolamento de fungos DSEF foi adequada para a obtenção de elevado número de isolados fúngicos pouco similares genotipicamente. Ademais, a alta diversidade genotípica observada através da região ITS também demonstra elevada diversidade de DSEF associadas com espécies de arroz silvestre *O. glumaepatula* que ocorrem em ambientes amazônicos.

Quando o agrupamento das sequências foi realizado pelo método “Neighbor joining” usando o modelo “Kimura two-parameter” observou-se que os isolados foram reunidos em nove grupos distintos, considerando uma similaridade genotípica de cerca de 97% entre os isolados de cada grupo (figura 6). Todos os isolados que apresentaram comportamento fitopatogênico no experimento de reinoculação agruparam-se nos grupos A, B e C (figura 6).

No grupo A, as espécies reuniram-se com *Curvularia trifolli*, *Curvularia eragrostidis* e *Cochliobolus lunatus* as quais são fitopatogênicas. No grupo B cinco isolados apresentaram similaridade de 99% com espécies de *Leptosphaeria* sp. e *Perisporiopsis* sp. e no grupo C, quatro isolados formaram um grupo com as espécies *Phoma multirostrata*, *P. pereupyrena*, *P. insulana* e *Didymella macropodii* a 98% de similaridade.

Interessantemente, não só os 14 isolados fúngicos que apresentaram patogenicidade quando reinoculados se agruparam nos grupos A, B e C, mas também outros 14 isolados que não apresentaram sintomas visíveis de patogenicidade como é o caso dos fungos ERR18, ERR39, ERR21, ERR28, ERR27, ERR08, ERR25, ERR09, ERR34, ERR12, ERR36, ERR02, ERR41 e ERR07. De fato, a obtenção de isolados fúngicos com características endofíticas que não desencadeiam sintomas de patogenicidade, mas são pertencentes a gêneros patogênicos como *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Nigrospora*, *Phoma* e *Verticillium* têm sido frequentemente relatado (PHOTITA et al., 2001).

É possível que alguns patógenos apresentem uma fase latente dentro do tecido do hospedeiro que, em decorrência de alterações ambientais bióticas e/ou abióticas, pode induzir a transição de um modo de vida para o outro a depender da condição fisiológica do vegetal (FISHER et al., 1992). Por exemplo, a espécie fúngica *Fusarium moniliforme*, que em geral causa a podridão de raízes, e de talos de milho (RHEEDER et al., 1992; BACON; HINTON, 1996), em ecossistemas temperados e tropicais sua presença é mais comum como endofítico do que como patógeno (KEDERA; LESLIE; LAFLIN, 1994;). É provável que fatores ambientais como umidade, temperatura, níveis de precipitação e alterações na fisiologia do hospedeiro definam o comportamento dos micro-organismos em interação com as plantas (PHOTITA et al., 2004).

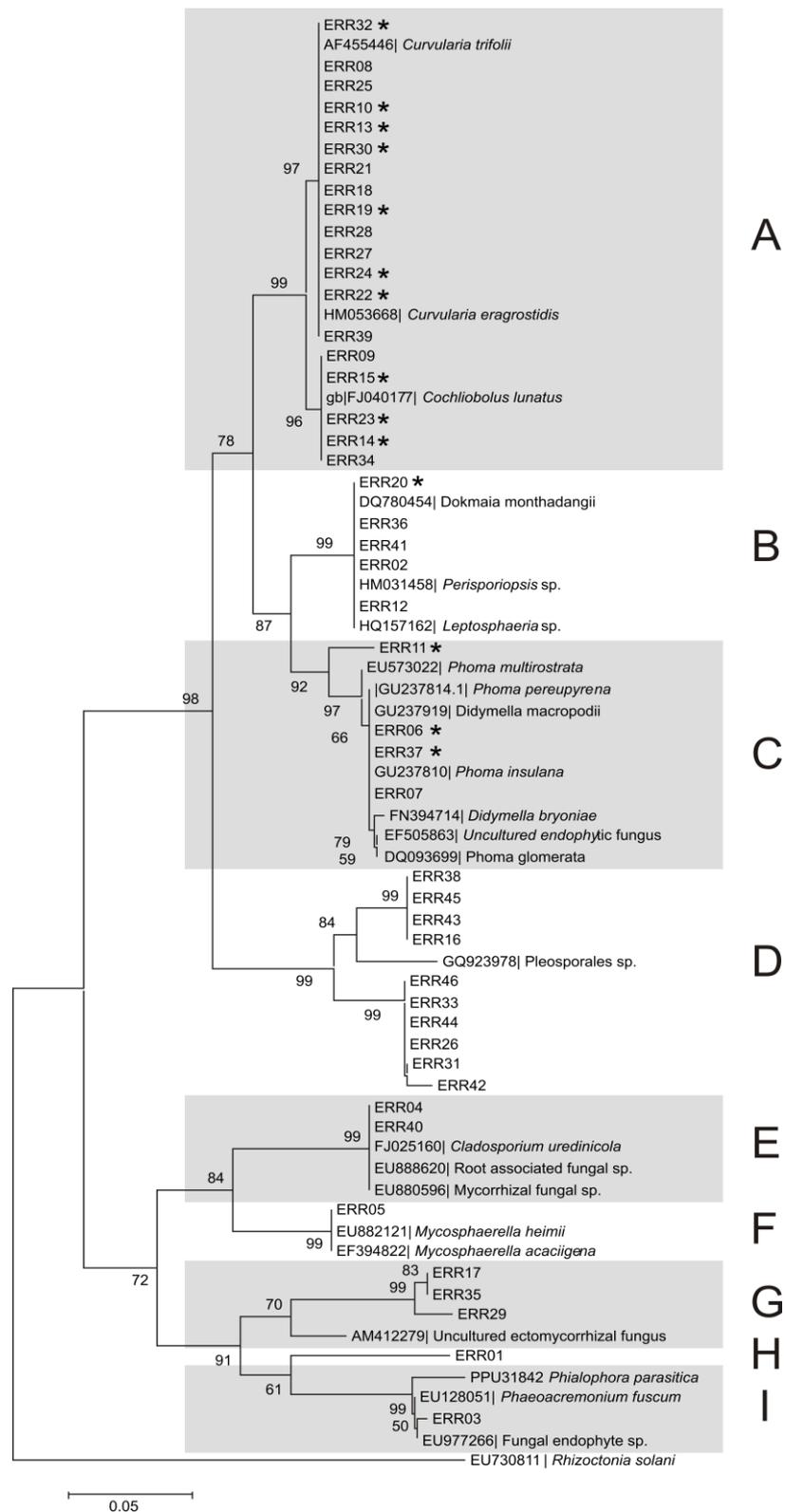


Figura 6: Árvore filogenética da região ITS1-5.8s-ITS2 do rDNA dos fungos isolados de arroz silvestre no Estado de Roraima. Árvore foi construída pelo método “Neighbor-joining” e o cálculo da distância foi realizado utilizando o modelo Kimura-two-parameter. Somente valores acima de 50% (1000 repetições) são apresentados. (*) Isolados fúngicos que em experimento de reinoculação em arroz silvestre *O. glumaepatula* apresentaram comportamento fitopatógeno.

O grupo D (figura 6) foi o que apresentou maior divergência filogenética comparativamente aos demais grupos e, quando os isolados foram analisados pelo BLAST apresentaram no máximo 90% de similaridade com sequências de outros fungos depositados no NCBI, particularmente da ordem Pleosporales, que abriga, por exemplo, a espécie de DSEF *Paraphaeosphaeria pilleata* (ADDY; PIERCEY; CURRAH, 2005; PORRAS-ALFARO et al., 2008).

Em trabalho realizado com a gramínea *Bouteloua gracilis*, no Novo México, foi possível observar alta colonização por DSEF, compreendendo pelo menos 10 ordens de fungos diferentes, os quais eram endofíticos, micorrízicos, saprófitas e patogênicos de plantas. Os autores observaram ainda que a comunidade de fungos dominante era um grupo de DSEF agrupados dentro da ordem Pleosporales. A análise molecular das sequências desses isolados obtidos mostrou baixa similaridade (menos de 97% de semelhança) com as sequências existentes no banco de dados do NCBI, sugerindo serem novas espécies para a ciência (PORRAS-ALFARO et al., 2008). Desta forma, é presumível que os isolados obtidos de *O. glumaepatula* possam pertencer a um novo grupo de espécies de DSEF agrupados dentro da ordem Pleosporales, não ainda descritas, e/ou não identificados geneticamente.

A maioria das espécies que compõem a ordem Pleosporales é saprofítica de material vegetal em ambientes aquáticos e terrestres, mas algumas espécies também estabelecem interações com as plantas do tipo parasitismo, epifitismo ou são endofíticos (PORRAS-ALFARO et al., 2008). Em gramíneas, a presença de espécies de fungos endofíticos agrupados na ordem Pleosporales é freqüente, sendo os gêneros mais comuns, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Phoma* e *Curvulária* (BATES; GARCIA-PICHEL; NASH, 2010), corroborando com dados obtidos neste trabalho.

Ao analisar as sequências de bases nucleotídicas dos isolados pertencentes ao grupo D, verificou-se que os dez isolados possuem dentre outras divergências nas bases nucleotídicas, uma inserção de 32 bases na região ITS2 que difere de todos os outros isolados e padrões utilizados como referência, a exceção do fungo depositado no ncbi GQ923978 (figura 7). Este fato reforça a hipótese de possivelmente serem novas espécies ou gêneros fúngicos ainda não descritos.

 305 315 325 335 345 355
ERR01	-----	-----	-----	--GCGGCTCG	GTGTTGGGGC	T-CTACAGCG
ERR02	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGGC	TTTGTCTG-
ERR03	-----	-----	-----	--GTTGCCTG	GTGTTGGGGC	G--CCGC----
ERR04	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTATTGGGCA	A--CGCG---
ERR05	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTATTGGGGC	T--CGCG---
ERR06	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGTG	TTTGTCTCGC
ERR07	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGTG	TTTGTCTCGC
ERR08	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR09	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTTTGTCT
ERR10	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR11	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGTG	TTTGTCTCGC
ERR12	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTGTCTG-
ERR13	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR14	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTTTGTCT
ERR15	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTTTGTCT
ERR16	G-TGTTGCC	TGCCCTGGC	GAGGGCTCCG	C-CTGGTTTG	GTGTTGGGCG	CCTGTCCCC-
ERR26	GGTGATGTCC	CGCCTCGCG	GCGGACCCCA	CTCCGGCTTG	GTGTTGGGTG	CCTGTCCCC
ERR31	GGTGATGTCC	CGCCTCGCG	GCGGACCCCA	CTCCGGCTTG	GTGTTGGGTG	CCTGTCCCC
ERR33	GGTGATGTCC	CGCCTCGCG	GCGGACCCCA	CTCCGGCTTG	GTGTTGGGTG	CCTGTCCCC
ERR38	G-TGTTGCC	TGCCCTGGC	GAGGGCTCCG	C-CTGGTTTG	GTGTTGGGCG	CCTGTCCCC-
ERR46	GGTGATGTCC	CGCCTCGCG	GCGGACCCCA	CTCCGGCTTG	GTGTTGGGTG	CCTGTCCCC
ERR42	GGTGATGTCC	CGCCTCGCG	GCGGACCCCA	CTCCGGCTTG	GTGTTGGGTG	CCTGTCCCC
ERR43	G-TGTTGCC	TGCCCTGGC	GAGGGCTCCG	C-CTGGTTTG	GTGTTGGGCG	CCTGTCCCC-
ERR44	GGTGATGTCC	CGCCTCGCG	GCGGACCCCA	CTCCGGCTTG	GTGTTGGGTG	CCTGTCCCC
ERR45	G-TGTTGCC	TGCCCTGGC	GAGGGCTCCG	C-CTGGTTTG	GTGTTGGGCG	CCTGTCCCC-
ERR17	-----	-----	-----	--GGGGCTTG	GTGTTGGGCG	TTCTGCG--G
ERR18	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR19	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR20	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTGTCTG-
ERR21	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTCT
ERR22	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR23	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTTTGTCT
ERR24	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR25	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR27	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR28	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR29	-----	-----	-----	--GGGGCTTG	GTGTTGGGCG	TTCTGCG--G
ERR30	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR32	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR34	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTTTGTCT
ERR35	-----	-----	-----	--GGGGCTTG	GTGTTGGGCG	TTCTGCG--G
ERR36	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTG-
ERR37	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGTG	TTTGTCTCGC
ERR39	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTTGTCTTT
ERR40	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTATTGGGCA	A--CGCG---
ERR41	-----	-----	-----	--G---CTTG	GTGTTGGGCG	TTTGTCTG-
Pleosporales	G-TGTTGCC	TGGCTCTGGC	GAGGGCTGCG	C-CAGGCTTG	GTGTTGGGCG	TCTGTCCCC-

Figura 7: Sequências de bases nucleotídicas de parte da região ITS2 de isolados de DSEF obtidos de *Oryza glumaepatula*. Os isolados destacados representam o grupo D da figura 6. Os números na parte superior da Figura indicam a sequência de bases 5' 3' obtidas a partir da PCR utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4, onde a base 1 inicia no iniciador ITS1 (White et al., 1990).

Os isolados, ERR04 e ERR40 se agruparam com similaridade inferior a 94% com *Cladosporium uredinicola*, com um isolado de fungo micorrízico e com um endofítico no grupo E; enquanto o isolado ERR05 foi agrupado a 96% de similaridade com o fungo *Mycosphaerella heimii* no grupo F; os isolados fúngicos ERR17, ERR35 e ERR29 foram agrupados no grupo G e apresentaram pelo menos 95% de similaridade com a sequência do fungo ectomicorrízico não cultivado; o isolado ERR01 ficou isolado no grupo H e quando analisado no BLAST mostrou menos de 90% de similaridade com outras sequências depositadas no ncbi; e o

isolado ERR03 do grupo I mostrou similaridade com as espécies já descritas: *Phialophora parasítica* e *Phaeoacremonium fuscum*, de apenas 94% e 97%, respectivamente. O gênero *Phialophora* abriga espécie comumente relatada como DSEF e é encontrado vivendo principalmente em gramíneas (SIEBER, 2002 SIEBER, 2002 apud YUAN et al., 2010).

Todos os gêneros com os quais os isolados fúngicos agrupados no grupo E, F, G, H e I apresentaram similaridade (*Cladosporium*, *Mycosphaerella*, *Phialophora*) são habitualmente citados por causar doenças em espécies vegetais. No entanto, no experimento de reinoculação nenhum desses isolados apresentou sintomas negativos visíveis. Também se observou que os isolados ERR1, ERR3, ERR4 e ERR5, os quais foram inoculados *in vitro* e em casa de vegetação em arroz comercial, apesar de terem sido agrupados com as espécies patogênicas, apresentaram similaridades que variaram de 94 a 97%. Isto indica que estes isolados devem representar novos grupos de DSEF ainda não estudados.

Estes resultados demonstram a presença de uma alta diversidade de fungos endofíticos em interação com plantas de *O. glumaepatula* e sugere que essas comunidades de fungos desempenham importante papel na sobrevivência das plantas em ambientes oligotróficos a qual estão inseridas, bem como podem estar envolvidos na manutenção da dinâmica e funcionamento do ecossistema.

5 CONCLUSÕES

1 – A utilização do meio de cultura ágar malte, da água destilada, da água destilada mais glicerol e a estimativa da colonização através da lâmina quadriculada se mostraram eficientes para o isolamento, armazenamento e determinação da percentagem de colonização de plantas de arroz por DSEF.

2 – O uso do meio de cultivo com ágar e a solução de Hoagland permite avaliar a capacidade de colonização de DSEF em plantas de arroz.

3 – Em condições naturais, plantas de áreas secas apresentam maior colonização por DSEF comparativamente a áreas alagadas ou de solo encharcado.

4 – Em condições naturais, plantas em estágio reprodutivo apresentam maior colonização por DSEF comparativamente com plantas em estágio juvenil.

5 - A espécie *Oryza glumaepatula* abriga alta diversidade de DSEF, inclusive com espécimes/ou espécies ainda não identificados geneticamente, necessitando de estudos de morfologia para a taxonomia adequada.

6 - Novos estudos se fazem necessários para a elucidação dos fatores que interferem na colonização de DSEF em arroz cultivado em solo ou substrato.

REFERÊNCIAS

ADDY, H. D.; HAMBLETON, S.; CURRAH, R. S. Distribution and molecular characterization of the root endophyte *Phialocephala fortinii* along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta. **Mycological Research**, s.l., v. 104, n. 10, p.1213–1221, out. 2000.

ADDY, H. D.; PIERCEY, M. M.; CURRAH, R. S. Microfungal endophytes in roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 83, n. 1, p.1-13, jan. 2005.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 3.ed. Nova Iorque: Academic Press, 1988. 206 p.

AHLICH, K.; SIEBER, T. N. The profusion of *Dark septate* endophytic fungi in non-ectomycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. **New Phytologist**, Oxford, v. 132, n. 2, p.259–270, fev. 1996.

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. de. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p.467-470, 2005.

APTROOT, A. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 2. Conspectus of *Mycosphaerella*. **Biodiversity Series**, s. l., v. 5, n. 47, p.1-23, 2006.

AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.117-137.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 8, p.1195–1202, ago. 1996.

BARROW, J. R.; AALTONEN, R. E. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by Dark septate fungi and the influence of host physiological activity. **Mycorrhiza**, Nova Iorque, v. 11, n. 4, p.199–205, jun. 2001.

BARROW, J. R.; OSUNA, P. Phosphorous solubilization and uptake by dark septate fungi in four wing saltbrush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. **Journal of Arid Environments**, Novo Mexico, v. 51, n. 3, p.449–459, jul. 2002.

BARROW, J. R. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. **Mycorrhiza**, Nova Iorque, v. 13, n. 5, p.239–247, fev. 2003.

BATES, T. S.; GARCIA-PICHEL, F.; NASH, H. T. Fungal components of biological soil crusts: insights from culture-dependent and culture-independent studies. **Bibliotheca Lichenologica**, Stuttgart, v. 105, p.197–210, 2010.

BREEN J. P. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, n. 1, p.401-423, jan. 1994.

BRUNDRETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. **Ecological Research**, Malden, v. 21, n. i, p.171-313, fev. 1991.

BUENO L.; GALLARDO, R. Preservação de hongos filamentosos em água destilada estéril. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 15, p.166-8, maio, 1998.

CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots, **FEMS Microbiological Letters**, Birmingham, v. 247, n. 2, p.147–152, jun. 2005.

CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Illinois, v. 70, p.181-184, 1967.

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**, Nova Iorque, v. 29, n. 3, p.328-337, fev. 2010.

CHRISTIE P.; KILPATRICK, D. J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza infection in cut grassland following long-term slurry application. **Soil Biology and Biochemistry**, Buderim, v. 24, n. 4, p.325-330, abr. 1992.

CORDEIRO; MEDEIROS. Desempenho produtivo de genótipos de arroz oriundos de hibridação interespecífica entre *Oryza sativa* e *Oryza glumaepatula* em várzea de Roraima. **Amazônia: Cia e desenvolvimento**, Belém, v. 5, n. 10, p.133-141, jan./jun., 2010.

COSTA-NETO, P. Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares.** São Carlos, 2002. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) Universidade Federal de São Carlos. 2002.

CROUS, P. W. et al. Novel species of Mycosphaerellaceae an Teratosphaeriaceae. **Persoonia**, Leiden, v. 23, n. 1, p.119–146, dez. 2009.

DETMAN, K. S. C. **Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo dark septate em plantas nativas de Cerrado.** Viçosa, 2007. 46p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa. 2007.

EL-MORSY, E. M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. **Fungal Diversity**, Chaing Mai, v. 5, n. 34, p.43–54, 2000.

FISHER, P. J. et al. A preliminary study of fungi inhabiting xylem and whole stems of *Olea europea*. **Sydowia**, Rennweg, v. 44, n. 55, p.117–121, 1992.

FRANCIS, R.; READ, D J. Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. S1, p.S1301-S1309, 1995.

GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, Malden, v. 33, n. 2, p.352-360, jun. 2001.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist.**, Oxford, v. 84, n. 3, p.489-500, mar. 1980.

GREEN, L. E.; PORRAS-ALFARO, A.; SINSABAUGH, R. L. Translocation of nitrogen and carbon integrates biotic crust and grass production in desert grassland. **Journal of Ecology**, Londres, v. 98, p.1076-1085, maio, 2008.

GRIST, D. H. **Rice**. London: Longman, 1975. 601 p.

GRÜNIG, C. R. et al. Spatial distribution of dark septate endophytes in a confined forest plot. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 106, n. 7, p.832–840, jul. 2002.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA, USA: University of California Press, 1950. 31p.

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**, Nova Iorque, v. 51, n. 4, p.374-381, abr. 2009.

JUMPPONEN, A.; MATTSON, K.; TRAPPE, J. M. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier fore front soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. **Mycorrhiza**, Nova Iorque, v. 7, n. 5, p.261–265, out. 1998.

JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. M. *Dark septate* root endophytes: a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis. **New Phytologist**, Oxford, v. 140, n. 2, p.295-310, set. 1998.

KAI, W., ZHIWEI, Z. Occurrence of arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in hydrophytes from lakes and streams in Southwest China. **Review Of Hydrobiology**, Ankara, v. 91, n. 1, p.29–37, fev. 2006.

KEDERA, C. J.; LESLIE, J. F.; LAFLIN, L. E. Genetic Diversity of Fusarium Section Liseola (*Gibberella fujikuroi*) in Individual Maize Stalks. **Phytopathology**, Nova Iorque, v. 84, n. 6, p.603-607, jan. 1994.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Zurique, v. 35, n. 1-2, p.25-34, set. 1997.

LINGFEI, L.; ANNA, Y.; ZHIWEI, Z. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in Southwest China. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 54, n. 3, p.367-373, nov. 2005.

LV, YA-LI. et al. The effect of cultivation conditions on the mycelial growth of a dark-septate endophytic isolate. **African Journal of Microbiology Research**, Scottville, v. 4, n. 8, p.602-607, abr. 2010.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. et al. Aspectos genéticos, morfológicos e de desenvolvimento de plantas de arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. DE (Ed). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2004, p.23-44.

MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Abundance and possible functions of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 53, p.173-190, 2005.

MANDYAM, K. **Dark septate fungal endophytes from a tallgrass prairie and their continuum of interactions with host plants**. Manhattan, 2008 115f. Tese (Doctor of philosophy) - Division of Biology, College of Arts and Sciences, Kansas State University. 2008.

MÁRQUEZ, M. S. S. **Estudio de la micobiota endofítica asociada a las gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus***. Salamanca, 2009. 272f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Facultad de Biología, Universidad de Salamanca. 2009.

MÁRQUEZ, S. S. et al. Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. **Fungal Diversity**, Chaing Mai, v. 41, n. 1, p.115–123, jan. 2010.

MARINS, J. F.; 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**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p.13–19, jul. 2009.

MENKIS, A. et al. Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. **Mycology Research**, Amsterdam, v. 108, n. 8, p.965–973, ago. 2004.

MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. **Sydowia**, Rennweg, v. 54, p.46-58, 2000.

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

NEWSHAM, K. K. *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*. **New Phytologist**, Oxford, v. 144, n. 3, p.517–524, dez. 1999.

PAVAN, M. A.; BINGHAN, F. T. Toxicity of aluminum to coffee seedlings grown in nutrient solution. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 46, n. 5, p.993-997, jan., 1982.

PEREIRA, J. A. R. **A Cultura do arroz no Brasil: subsídios para sua história.** Brasília: Embrapa Meio Norte, 2002. 226 p.

PEREIRA, G. M. D. et al. Ocorrência de fungos endofíticos "dark septate" em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p.331-334, mar. 2011.

PETERSON, L. R.; WAGG, C.; PUTLER, M. Association between microfungus endophytes and roots: do structural features indicate functions? **Botany**, Birmingham, v. 86, n. 5, p.445-456, 2008.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, n. 55, p.789-796, 1992.

PHOTITA, W. et al. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, in Thailand. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 105, n. 12, p.1508-1513, 2001.

PHOTITA, W. et al. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. **Fungal Diversity**, Chaing Mai, v. 16, p.131-140, out. 2004.

PORRAS-ALFARO, A. et al. A novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 3, p.2805-2813, maio, 2008.

PROMPUTTHA, I. et al. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, s.l., v. 53, n. 4, p.579-590, maio, 2007.

RANGEL, P.H.N. et al. 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, p. 20-24.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. **New Phytologist**, Oxford, v. 151, n. 3, p.705-716, 2001.

REDMAN, R. et al. Thermo tolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, Washington, v. 298, n. 5598, p.1581, nov. 2002.

RIVERA-VARAS, V. V. et al. Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. **Phytopathology**, Minnesota, v. 97, n. 10, p.1331-1337, out. 2007.

RHEEDER, J. P. et al. *Fusarium moniliforme* and *Fumosins* in Corn in Relation to Human Esophageal Cancer in Transkei. **Phytopathology**, Nova Iorque, v. 82, n. 3, p.353-357, 1992.

RODRIGUES, E. G.; LIRIO, R. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 2, p.159-65, abr. 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.** Belo Horizonte, 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais. 2010.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. 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**, Oxford, v. 59, p.1109-1114, 2008.

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

RUIZ-LOZANO, J. M. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 151, p.493-502, 2001.

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**, Oxford, v. 79, n. 2, p.341-348, set. 1977.

SANTOS, E. A.; SILVA, M. C. S.; FRANÇA, A. C.; CAMPOS, A. N. R.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, J. B. Ocorrência de fungos micorrízicos em plantas daninhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27, 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: SBPC, 2010. p. 677- 682.

SATHIYADACH, K.; MUTHUKUMAR, T. E. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte fungal associations in South Indian grasses. **Symbiosis**, Nova Iorque, v. 52, n. 1, p.21-32, out. 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**, Buderim, v. 41, n. 8, p.1753-1756, ago. 2009.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, Amsterdam, v. 109, n. 6, p.661-686, jun. 2005.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p.4870-4876, dez. 1998.

SELOSSE, M. A.; TACON, L. E. F. The land flora: a phototroph–fungus partnership? **Trees**, Champenoux, v. 13, p.15–20, 1998.

SILVA, C. M. et al. Elevada diversidade genética interpopulacional em *Oryza glumaepatula* Steud. (Poaceae) avaliada com microssatélites. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 7, n. 2, p.165-172, jul. 2007.

SILVA, J. C. et al. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, Caracas, v. 30, n. 1, p.48-54, jan. 2010.

SILVA, L. M; **Isolamento e Caracterização de Bactérias Diazotróficas em Arroz Silvestre (*Oryza glumaepatula*) no Estado de Roraima**. Boa Vista, 2010. 44f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Roraima. 2010.

SILVANI, V. A. et al. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Buderim, v. 40, n. 5, p.1259-1263, maio, 2008.

SMIDERLE, O. J.; GIANLUPPI, D.; GIANLUPPI, V. Adubação nitrogenada, espaçamento e época de semeadura de girassol nos Cerrados de Roraima. In: EMBRAPA. **Resultados de pesquisa da EMBRAPA Soja-2001: girassol e trigo**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p.33-39.

SRAJ-KRZIC, N. et al. Mycorrhizal colonization in plants from intermitent aquatic habitats. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 85, n. 4, p.331–336, nov. 2006.

STADDON, P. L.; HEINEMEYER, A.; FITTER, A. H. Mycorrhizas and global environmental change: research at different scales. **Plant and Soil**, Crawley, v. 1-2, n. 244, p.253-261, abr. 2002.

STROBEL, G.; DAYSE, B. Biprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p.491-502, dez. 2003.

SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V.; JOHNSON, J. A. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p.1003–1006, 1998.

MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Tokyo: **Molecular Biology and Evolution**, 2011. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2011/05/04/molbev.msr121.abstract>>. Acesso em 30 set. 2011.

USUKI, F.; NARISAWA, K. A. mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. **Mycologia**, Filadélfia, v. 99, n. 2, p.175–184, dez. 2007.

VAUGHAN, D. A. **The wild relatives of rice**: a genetic resources handbook. Los Baos (Philippines): International Rice Research Institute, 1994.

VAUGHAN, D. A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p.139-146, abr. 2003

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

WEISHAMPEL, P. A.; BEDFORD, B. L. Wetland dicots and monocots differ in colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. **Mycorrhiza**, Nova lorque, v. 16, n. 7, p.495–502, ago. 2006.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A; GELFAND, D.H, SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, 1990, p.315–322.

WU, L.; GUO, S. Interaction between an isolate of dark-septate fungi and its host plant *Saussurea involucrata*. **Mycorrhiza**, Nova lorque, v. 18, n. 2, p.79–85, jan. 2008.

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**, Birmingham, v. 307, n. 5, p.94–101, abr. 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**, Nova lorque, v. 49, n. 1, p.15-23, fev. 2011.

ZHANG, G. X. et al. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Archives of Microbiology**, Nova lorque, v. 189, n. 5, p.431-439, maio, 2008.

ANEXOS

ANEXO A - DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES

1. Colocar as sementes de arroz descascadas em recipiente limpo e estéril;
2. Cobrir as sementes com álcool 70% por 1 a 3 minutos para modificação da tensão superficial;
3. Drenar o álcool;
4. Cobrir as sementes com NaClO a 2,5% por 10 minutos;
5. Drenar o NaClO;
6. Lavar 3 vezes as sementes com água destilada estéril;
7. Cobrir as sementes com H₂O₂ a 10% por 3 minutos;
8. Drenar o H₂O₂;
9. Lavar 5 vezes as sementes com água destilada estéril.

ANEXO B – DESCOLORAÇÃO E COLORAÇÃO DE RAÍZES DE *O. glumaepatula*

1. Acondicionar segmentos de raízes de 1-2 cm de comprimento em recipiente adequados;
2. Clarificar as raízes com solução de KOH 10 % por 1h. Assegurar que todas as raízes estejam cobertas pela solução;
3. Drenar o KOH;
4. Lavar com água até remoção completa do KOH;
5. Adicionar solução de HCl 1 % durante 5 minutos;
6. Drenar o HCl, sem lavar as raízes;
7. Adicionar, nas raízes, solução de Azul de Tripano em lactoglicerol 0.05 %, aquecer a 70 °C durante 15 minutos até a coloração das estruturas fúngicas;
9. Deixar esfriar a temperatura ambiente;
10. Armazenar os segmentos de raízes coradas em recipiente identificado contendo solução lactoglicerol (2:1:1; ácido láctico:glicerina:água).

Observação:

- O tempo pode variar com a espécie da planta estudada e a idade das raízes.
- Fazer teste prévio sob microscópio estereoscópio a intensidade da coloração das estruturas fúngicas. Caso seja necessário retirar excesso de corante das raízes, colocar lactoglicerol por 4 a 10 minutos.

ANEXO – C MEIO DE CULTURA E SOLUÇÃO ESTOQUE DE HOAGLAND (MODIFICADO)

Protocolo para a Solução de Hoagland (Modificado)

Reagente	Quantidade	Preparo da solução estoque
KH_2PO_4	1mL	Solução 1 M (68,5g em 0,5L de água destilada esterilizada)
K_2HPO_4	1mL	Solução 1 M (87,1g em 0,5L de água destilada esterilizada)
KCL	1mL	Solução 0,03 M (2g em 1L de água destilada esterilizada)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2mL	Solução 1 M (123,23g em 0,5L de água destilada esterilizada)
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,172g	
Solução de micronutrientes para a solução de Hoagland	1mL	H_3BO_3 ...2,86g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$...1,91g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$...0,22 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$...0.08 g; $\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$...0.02 g Completar o volume para 1L com água destilada esterilizada
Solução de Fe para a solução de Hoagland	1mL	1,21g de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ /100 mL de água destilada esterilizada, misturar bem e adicionar 0,64 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Água destilada esterilizada	Completar o volume de 1L	
Ágar		12 g L ⁻¹
Obs 1 - Verificar o pH que deve estar entre 6,5 e 7,0. Se necessário corrigi-lo com uma solução de KOH (10%) ou HCL (10%).		
Obs 2 - Para volumes de solução maiores que 1 L multiplicar o volume da solução pelo volume ou massa do reagente listado acima		
Obs 3 - Para o preparo da solução estoque usar vidraria e água esterilizadas		