

Fungos endofíticos do tipo “dark septate” colonizam e promovem crescimento em plantas de arroz⁽¹⁾

Silvana Gomes dos Santos⁽²⁾; Carlos Vergara Torres Junior⁽²⁾; Elyakim Alves Ramos Santos⁽³⁾; Leonardo dos Santos França Shockness⁽⁴⁾; Jerri Édson Zilli⁽⁵⁾; Ricardo Luiz Louro Berbara⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos oriundos da Faperj, Capes, UFRRJ e Embrapa Agrobiologia.

⁽²⁾ Estudante de mestrado em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, silvanagomess@yahoo.com.br, vergaratorres@yahoo.com.br.

⁽³⁾ Estudante de graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro elyakim_alves@oi.com.br

⁽⁴⁾ Estudante de graduação em Agronomia, Universidade Federal de Rondônia, Rolim de Moura, Rondônia, leonardoshockness@hotmail.com.

⁽⁵⁾ Pesquisador, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, zilli@cnpab.embrapa.br

⁽⁶⁾ Professor, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, rberbara@yahoo.com.br

RESUMO: Fungos endofíticos negros são endófitos associados a um grande número de plantas com funções aparentemente similares à dos fungos micorrízicos arbusculares por produzirem hifas extras-radulares e enzimas extracelulares que podem melhorar a exploração do ambiente e promover o crescimento dos vegetais, além de estarem comumente associados às condições de estresses abióticos. Desta forma, avaliou-se a capacidade de 4 isolados de DSE em colonizar e promover o crescimento de duas variedades de arroz. Sendo assim, sementes foram microbiolizadas em discos de micélios fúngicos e crescidas em meio phytigel sob condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo. Aos 30 dias avaliou-se a altura e massa seca da parte aérea e comprimento da raiz principal, além disso, foi feita a visualização das estruturas fúngicas nas raízes através da coloração com corante azul de metila e observação em microscópio óptico. As plantas e os isolados apresentaram crescimento vigoroso no meio de cultivo utilizado, a microbiolização das sementes mostrou-se suficiente para garantir a colonização das plantas, maiores quantidades de hifas septadas foram observadas nas raízes inoculadas com o isolado ERR01, além disso, este isolado foi capaz de incrementar em média 3,5 cm o crescimento da raiz principal das plantas inoculadas. O uso de Phytigel como meio de cultivo possibilitou uma boa visualização da colonização das raízes pelos DSE. Todos os isolados avaliados foram capazes de colonizar ambas as variedades de arroz. O isolado ERR01 promoveu maior crescimento do sistema radicular das plantas inoculadas.

Termos de indexação: DSE, colonização, promoção de crescimento.

INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos negros (Dark Septate Endophyte - DSE) apresentam como características básicas a pigmentação escura intensa, formação de hifas septadas e microescleródios que crescem inter e intracelularmente às células do córtex dos vegetais, além não ser biotrófico obrigatório, diferentemente dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA). São colonizadores de diversos tipos de plantas relacionando-se principalmente as condições abióticas (BARROW et al., 2003; BARROW & AALTONEN, 2001; YUAN et al., 2010). Segundo Mandyam & Jumpponen, (2005) os fungos DSE podem ser tão abundantes quanto os FMA ou até mais, possuindo uma grande distribuição geográfica e uma relação com ambientes estressantes, como os solos oligotróficos. Desta forma, os fungos DSE podem desempenhar diversas funções nos ecossistemas associados a uma grande diversidade de espécies vegetais como, arroz (YUAN et al, 2010; PEREIRA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2011). A associação de arroz com microrganismos do solo tem sido bem evidenciada, principalmente com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias endofíticas, benefícios resultante desta interação já são bastantes conhecidos, sendo a promoção do crescimento do hospedeiro bastante relatada (GLASSOP et al., 2007; MATTOS et al., 2008), no entanto, pouco ainda se sabe sobre os efeitos decorrente da associação com DSE.

Benefícios da associação com fungos DSE já estão sendo elucidados e apontam uma função similar a uma associação mutualística semelhante as que ocorrem entre os FMA e seus hospedeiros, por produzirem hifas extra-radulares e enzimas extracelulares como as lacases, celulases, xylanases e pectinases que podem melhorar a aquisição de nutrientes e água por possibilitar uma maior exploração do ambiente pelos vegetais

(LINGFEI et al., 2005). Desta forma objetivou-se avaliar a capacidade de quatro isolados de DSE em colonizar e promover o crescimento de duas variedades de arroz em meio Phytigel.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica-RJ sob condições controladas (temperatura 28/24°C dia e noite, umidade 50% e fotoperíodo de 12 hs onde foi avaliada a técnica de inoculação, a taxa de colonização e a promoção de crescimento de plantas de duas variedades de arroz (Nippombare e Piauí) inoculadas com 4 isolados de DSE por meio da microbiolização das sementes em disco de micélio fúngico crescido por 7 dias em meio BDA a 28 °C no escuro. As plantas foram crescidas em tubos contendo 50 ml de meio Phytigel (5g/l) dissolvido em solução de Hoagland ½ força estéril (HOAGLAND et al., 1950).

As plantas foram colhidas aos 30 dias e realizado às medidas de altura da parte aérea e comprimento da raiz principal, posteriormente dividida em parte aérea e raiz, sendo a parte aérea seca em estufa para obtenção da massa seca e as raízes destinadas às análises da colonização.

Os dados de massa seca e comprimento de raiz foram analisados no programa SISVAR e as médias comparadas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

A observação das estruturas fúngicas dos DSE foi feita por meio da fragmentação das raízes que foram clareadas com solução de KOH (2,5%) em banho Maria a 45°C por 1h e neutralizadas em meio ácido (HCL 1%) por 1 h, posteriormente estas raízes foram coradas com corante azul de metila (0.05%) e realizado a montagem das lâminas a partir desses fragmentos para observação das estruturas fúngicas em microscópio ótico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A observação da colonização dos DSE nas raízes das plantas de arroz em meio Phytigel foi possível nas duas variedades avaliadas. Todos os fungos e as duas variedades de arroz apresentaram crescimento vigoroso no meio de cultivo. Foram observadas estruturas típicas de DSE (hifas septadas) em ambas as variedades com auxílio de microscópio óptico (aumento de 100X), não foi observado à presença de microescleródio. A inoculação dos fungos DSE por meio da

microbiolização das sementes mostrou-se suficiente para garantir a colonização do fungo nas raízes das plantas de arroz conforme **figura 1**, no entanto, a colonização concentrou-se próximo ao colo o que não possibilitou a quantificação da percentagem da raiz colonizada pelos endófitos.

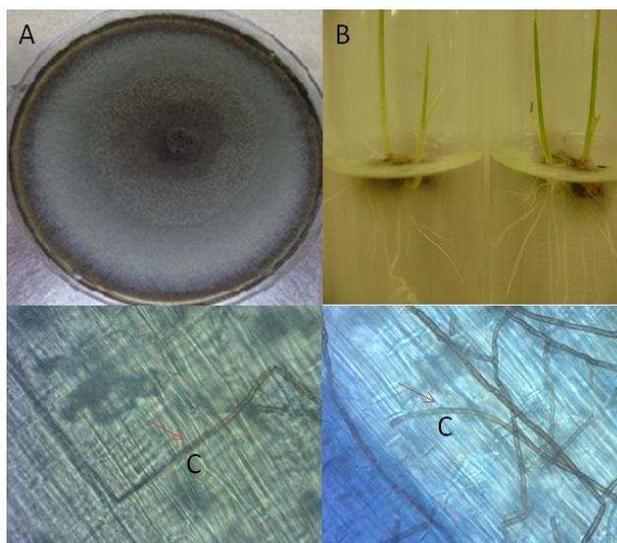


Figura 1 – Colonização de plantas de arroz por “dark septate” cultivadas em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força estéril. (A) Morfologia da colônia fúngica (B) Colonização externa de plantas de arroz por DSE aos 5 dias após microbiolização da semente (C) Presença de hifas septadas nos fragmentos de raízes coradas com corante azul de metila e visualizadas em microscópio óptico (aumento de 100X).

Os quatro isolados inoculados foram capazes de colonizar as duas variedades de arroz avaliadas, no entanto, uma maior quantidade de hifas foi observada nas raízes das plantas inoculadas com o isolado ERR 01, além disso, os DSE foram capazes de promover o crescimento das plantas (**tabela 1**) através do estímulo ao maior crescimento da raiz principal quando comparadas a testemunha (tratamento não inoculado). Os demais isolados apresentaram uma colonização baixa e concentrada próximo ao colo das plantas, o que não possibilitou a quantificação da percentagem de colonização.

Não houve interação significativa entre os isolados e as variedades, de um modo geral, todos os isolados promoveram o crescimento das raízes em ambas as variedades, no entanto, o isolado ERR 01 diferiu estatisticamente em relação ao comprimento da raiz principal das plantas inoculadas, apresentando em média um sistema radicular 3,45 cm superior em comparação a testemunha.

Possivelmente o efeito do mesmo sobre as

raízes das plantas inoculadas neste experimento está relacionado à maior capacidade e velocidade de colonização desse endófito em detrimento aos demais isolados, o que pode ter favorecido esta simbiose.

Tabela 1 - Médias de comprimento de raiz (Craiz), massa seca de parte aérea (Mspa) e altura de oito plantas de arroz aos 30 dias após a inoculação dos isolados de DSE e um tratamento testemunha (sem inoculação) em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força.

Tratamentos	Craiz (cm)	Mspa (g)	Altura (cm)
ERR01	15,65 A	0,057 A	23,83 A
ERR16	15,01 AB	0,065 A	24,46 A
ERR46	13,91 ABC	0,052 A	22,47 A
ERR04	12,82 BC	0,061 A	22,93 A
Testemunha	12,40 C	0,060 A	21,91 A
CV (%)	11,2	16,78	11,6

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

A baixa colonização e de forma concentrada próximo ao colo das plantas pode estar relacionada à duração do experimento em apenas 30 dias, pois como demonstrado por Ribeiro et al. (2012) há uma influência do estágio fisiológico da planta na taxa de colonização por DSE, de tal forma que, maiores taxas de colonização de DSE isolados de arroz silvestre coletadas diretamente no ambiente, áreas secas e alagadas na região amazônica, foram obtidas de raízes de plantas em estágio reprodutivo. Experimentos realizados na região amazônica por estes mesmos autores mostraram que a taxa de colonização de isolados de DSE obtidos de arroz silvestre (*Oryza. glumaepatula*) variou entre 20 a 60% quando reinoculado na espécie hospedeira e inoculado em arroz comercial (*Oryza. sativa*), sendo de forma geral maior para espécie *O. sativa*.

Promoção de crescimento de arroz inoculado com DSE foi evidenciado por Yuan et al, 2010 quando inoculou o isolado *Harpophora oryzae* obtido de raízes de arroz silvestre na China em plantas de arroz comercial (*Oryza Sativa* L.) cultivadas em meio de cultura sob condições estéreis observou um incremento do peso seco das plantas inoculadas em aproximadamente 40%.

CONCLUSÕES

O uso de Phytigel como meio de cultivo possibilitou uma boa visualização da colonização das raízes pelos DSE.

Todos os isolados avaliados foram capazes de colonizar ambas as variedades de arroz.

O isolado ERR01 promoveu maior crescimento do sistema radicular das plantas inoculadas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, à Embrapa Agrobiologia, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

- 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 hostphysiological activity. *Mycorrhiza*, v.11, n. 4, p.199–205, jun., 2001.
- GLASSOP, D., R. M. GODWIN, S. E. SMITH, AND S. W. SMITH.. Rice phosphate transporters associated with phosphate uptake in rice roots colonized with arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 85:644–651, 2007.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, CA, USA : University of California Press, 1950.31p.
- LINGFEI, L.; ANNA, Y.; ZHIWEI, Z. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in Southwest China. *Microbiology Ecology*, v.54, n.3, p.367-373, nov., 2005.
- MANDYAM, K. AND JUMPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud. Mycol.* 53, 173–189, 2005.
- MATTOS, K. A., V. L. PA'DUA, A. ROMEIRO, L. F. HALLACK, B. C. NEVES, T. M.ULISSES, C. F. BARROS, A. R. TODESCHINI, J. O. PREVIATO, AND L. MENDONC,APREVIATO. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *An. Acad. Bras. Cienc.* 80:477–493, 2008.
- RIBEIRO, K. G. ; PEREIRA, G. M. D ; MOSQUEIRA ; BARAÚNA, A. C. ; VITAL, M.J.S ; SILVA ; ZILLI, J. E. Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos dark septate a partir de plantas de arroz. *Agro@mbiente On-line*, v. 05, p. 97/2-105, 2012.
- PEREIRA, G. M. D. et al. Ocorrência de fungos endofíticos "dark septate" em raízes de *Oryza*



XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO

28 de julho a 2 de agosto de 2013 | Costão do Santinho Resort | Florianópolis | SC

4

glumaepatula na Amazônia. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 46: 331-334. 2011.

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

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



XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO

28 de julho a 2 de agosto de 2013 | Costão do Santinho Resort | Florianópolis | SC