

Foto: Karen Gonçalves Ribeiro



## Metodologias para isolamento, avaliação da colonização em plantas e manutenção de fungos endofíticos "dark septate" a partir de plantas de arroz

Karen Gonçalves Ribeiro<sup>1</sup>  
Gilmara Maria Duarte Pereira<sup>2</sup>  
Krisle da Silva<sup>3</sup>  
Jerri Édson Zilli<sup>4</sup>

### Introdução

Fungos endofíticos conhecidos como DSEF ou "dark septate" são caracterizados por apresentarem pigmentação escura intensa, formarem hifas septadas e microescleródios que crescem inter e intracelularmente às células do córtex vegetal (JUMPPONEN e TRAPPE 1998; BARROW e AALTONEN, 2001). Este grupo de fungos apresenta ampla distribuição geográfica, é frequentemente encontrado em ambientes estressantes, como solos oligotróficos, e desempenha funções ecológicas que coincidem com fungos saprofitos, simbióticos e até patogênicos (BARROW & AALTONEN, 2001; MANDYAM & JUMPPONEN, 2005).

Recentemente, este grupo de fungos tem chamado à atenção, pois tem se observado que os mesmos são capazes de estabelecer associações

semelhantes aos fungos micorrízicos; atuando como promotores do crescimento vegetal, principalmente por facilitarem a absorção de nutrientes como o fósforo e nitrogênio (MANDYAM & JUMPPONEN, 2005; SCERVINO et al., 2009; CHEN et al., 2010; ANDRADE-LINARES et al., 2011).

A grande vantagem dos DSEF comparativamente aos micorrízicos arbusculares, é o fato de não serem biotróficos obrigatórios, o que torna possível seu cultivo e multiplicação em meio de cultura. Esse fato confere facilidade e rapidez ao isolamento e a estruturação de coleções fúngicas, processos de grande relevância para dar suporte às pesquisas futuras de avaliação do potencial desses fungos como promotores de crescimento vegetal. Por outro lado, ainda se conhece muito

<sup>1</sup> Mestre em recursos naturais. Professora da Secretaria de Educação do Estado de Roraima. E-mail: karenkgr@gmail.com

<sup>2</sup> Doutora em Microbiologia Agrícola. Professora da Universidade Federal de Roraima/Centro de Estudos da Biodiversidade. E-mail: gmdpereira@hotmail.com

<sup>3</sup> Doutora em Microbiologia Agrícola. Pesquisadora da Embrapa Roraima. E-mail: krisle.silva@embrapa.br

<sup>4</sup> Agronomia/Ciência do Solo. Pesquisador da Embrapa Agrobiologia. E-mail: jerri.zilli@embrapa.br

pouco sobre a biologia, fisiologia e ecologia de espécies de DSEF que ocorrem no Brasil. Diante do exposto, além da investigação do potencial desses fungos como promotores de crescimento vegetal, são indispensáveis estudos básicos relativos aos processos de isolamento, de elucidação da capacidade dos mesmos crescerem em meio de cultura, colonizarem raízes das plantas e de viabilidade de armazenamento.

Este documento reúne metodologias para isolamento, avaliação da capacidade de colonização de raízes de plantas de arroz e armazenamento de DSEF. Estas metodologias mostraram-se eficientes para o isolamento e para a estruturação de uma coleção de DSEF a partir de arroz silvestre (*Oryza glumaepatula*) coletada em áreas da região Amazônica.

## Isolamento dos fungos e constatação das características de DSEF

As raízes das plantas do arroz são previamente lavadas em água potável, seccionadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento e desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% e peróxido de hidrogênio a 33% por 2 e 1 minuto, respectivamente. Os fragmentos de raízes são, então, distribuídos em triplicata em placas de Petri sobre o meio de cultura ágar-malte (ágar 15 g L<sup>-1</sup> e extrato de malte 20 g L<sup>-1</sup>) suplementado com cloranfenicol (100 mg L<sup>-1</sup>) e sulfametazol mais trimetropina (240 mg L<sup>-1</sup>). O uso de antibióticos no meio de cultura faz-se necessário, pois muitas bactérias presentes nas raízes podem permanecer após a desinfecção e atuar como antagonistas de fungos, não permitindo o seu crescimento (CAO et al., 2005; SILVANI et al., 2008).

Posteriormente, as placas inoculadas com os fragmentos de raízes são incubadas a 28 °C no escuro, sendo o aparecimento das colônias fúngicas monitorado diariamente até o décimo quinto dia após o isolamento. Aquelas colônias fúngicas escuras que surgem próximas às raízes devem ser transferidas para o meio ágar-malte e incubadas novamente nas mesmas condições anteriores. Após o novo crescimento das colônias escuras, deve ser verificada a pureza do material,

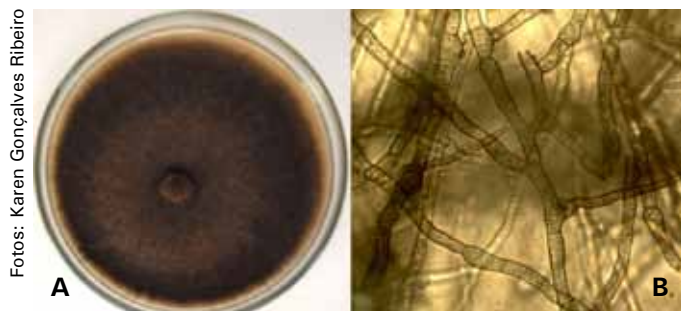
ou seja, a ausência de outros microrganismos nas placas, e fragmentos do micélio devem ser transferidos para lâminas para visualização em microscópio, a fim de confirmar a presença das de hifas septadas que é característica morfológica de DSEF.

No trabalho conduzido por Pereira et al. (2011) e Ribeiro et al. (2011) observou-se que cerca de 50% dos isolados fúngicos obtidos de arroz silvestre (46 isolados) foram confirmados como dark septate (exemplo, fig. 1A e B) após a visualização no microscópio, 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 dark septate (MÁRQUEZ, 2009; RODRIGUES, 2010).

## Armazenamento dos fungos "dark septate"

Não há na literatura uma indicação de um método padrão utilizado na preservação de DSEF, assim como para outros fungos filamentosos. Entretanto, a escolha do método deve levar em consideração principalmente a capacidade de manutenção das características fenotípicas e genotípicas das culturas estocadas (BUENO & GALLARDO, 1998; SILVA et al., 2010).

Dois métodos de armazenamento são sugeridos: i) o método clássico de armazenamento em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967) e, também ii) água destilada esterilizada adicionada de glicerol (100 mL L<sup>-1</sup>); sendo para ambos os métodos, os isolados mantidos a 5 °C. Para ambos os métodos, os isolados fúngicos são preparados para estocagem cultivando-se os mesmos em meio ágar-malte (conforme descrito anteriormente) até que o micélio fúngico ocupe todos os espaços da placa. A partir daí, fragmentos do meio de cultura contendo o micélio são removidos com o auxílio de uma espátula e transferidos para microtubos de 1,5 mL. Nesses tubos acrescenta-se a água destilada esterilizada ou, então, água destilada esterilizada adicionada de glicerol e estoca-se a 5 °C em geladeira.



Fotos: Karen Gonçalves Ribeiro

**Fig. 1.** Exemplo de morfologia das colônias de isolados de DSEF obtidos de raízes de *Oryza glumaepatula* cultivados em meio ágar malte a 28°C (A) e formação do micélio melanizado e septado (aumento de 1000X) (B).

No estudo realizado por Pereira et al. (2011) e Ribeiro et al. (2011) a cada 90 dias, alguns dos fungos estocados em ambos os métodos foram aleatoriamente separados e repicados em meio ágar-malte para verificação da viabilidade e manutenção das características morfológicas iniciais. Também no final de doze meses, averiguou-se o crescimento micelial e as características típicas de DSEF de todos os isolados fúngicos desta coleção.

Após o período de 12 meses de estocagem foi constatado que todos os isolados mantiveram sua viabilidade e as características fenotípicas iniciais, mostrando, portanto, que tanto a estocagem pelo método de Castellani (1967), quanto em água destilada adicionada de glicerol são métodos adequados para a manutenção da coleção de dark septate por, pelo menos, médio prazo.

## Avaliação da capacidade de colonização de plantas de arroz pelos DSEF

Inicialmente, as sementes do arroz devem ter a casca removida a fim de facilitar o processo de desinfestação. Esta desinfestação superficial pode ser realizada pela imersão em álcool (70%; 2 mim), hipoclorito de sódio (2-4%; 2 mim) e peróxido de hidrogênio (10%; 1 mim), e lavadas com água destilada esterilizada por 5 vezes também por imersão. Posteriormente, as sementes devem ser pré-germinadas em ágar-água (9g L<sup>-1</sup>) de modo a obter-se plântulas uniformes e livres de contaminantes. O plantio pode ser realizado em vasos confeccionados a partir de garrafas de vidro

que devem receber aproximadamente 300 mL de meio (solução de Hoagland ½ força (HOAGLAND e ARNON, 1950) e ágar 6 g L<sup>-1</sup>) esterilizado em autoclave (121°C; 60 mim; pressão de 1 ATM) ou, alternativamente aos vasos, placas de Petri com 15 cm diâmetro contendo 40 mL do mesmo meio (fig. 2A e B). Após a germinação, algumas plântulas (3 a 6) devem ser transferidas para os vasos ou placas de Petri, os quais são incubados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, temperatura e umidade relativa do ar variando de 25 a 28°C e 60-70%, respectivamente. Após quatro a cinco dias do transplântio realiza-se a inoculação das plantas depositando-se sobre o meio com solução de Hoagland três discos de meio ágar-malte com aproximadamente 3 mm de diâmetro contendo o micélio de cada isolado fúngico crescido por cerca de quatro dias. Semanalmente, cada vaso necessita receber de 1-2 mL de água destilada esterilizada para evitar a dessecação.

As plantas devem ser coletadas cerca de seis semanas após a inoculação, sendo o sistema radicular seccionado em fragmentos de aproximadamente 1 cm que devem ser fixados em FAA (formol, ácido acético e álcool etílico, na proporção 1:1:5, v/v, 60 mim). Posteriormente, as raízes são diafanizadas por imersão em solução de KOH (10% por 1h) à temperatura ambiente. Após este processo, as raízes são neutralizadas utilizando solução de HCl a 2% por 5 mim 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) por 10 minutos a temperatura ambiente (BRUNDRETT et al., 1996). A presença de microescleródios e hifas melanizadas septadas são, então, observadas em microscópio óptico (aumento de 400X).

A determinação da percentagem de colonização por DSEF pode ser realizada pelo método da contagem em lâmina (GIOVANNETTI e MOSSE, 1980), onde 40 segmentos de raízes por planta com aproximadamente 1 cm são tomados ao acaso e organizados paralelamente em uma lâmina de microscópio quadriculada (1 x 1 cm), com 3 repetições. Nas lâminas, todos os pontos de interseções das raízes com as linhas devem ser observados, sendo consideradas positivas aquelas em que forem visualizadas as estruturas típicas dos fungos DSEF. O cálculo da percentagem de

colonização é obtido pela média das três repetições, considerando o número de estruturas típicas observadas nos 40 fragmentos de raízes em cada lâmina.

No estudo conduzido por Pereira et al. (2011) e Ribeiro et al. (2011) foram realizados testes da capacidade de colonização de cinco isolados fúngicos de dark septate com características morfológicas distintas quando crescidos em meio ágar-malte e em duas espécies de arroz: *Oryza glumaepatula* (hospedeiro original dos isolados de dark septate) e *O. sativa* (arroz comercial). Observou-se que tanto nas placas quanto nos vasos contendo solução de Hoagland ½ força adicionada de ágar, os fungos cresceram vigorosamente e, além disso, as plantas apresentavam-se saudáveis, tanto na parte aérea quanto as raízes, até o final do período de avaliação (fig. 2A e B). Isso mostra que a estratégia de cultivo das plantas de arroz de ambas as espécies em meio contendo solução de Hoagland foi adequado para o desenvolvimento das plantas inoculadas com os diferentes isolados fúngicos.

A análise em microscópio permitiu verificar que todos os fungos testados colonizaram o córtex das raízes de ambas as espécies de arroz, formando hifas septadas e microescleródios, que são estruturas características da associação entre DSEF e a planta hospedeira (fig. 3).

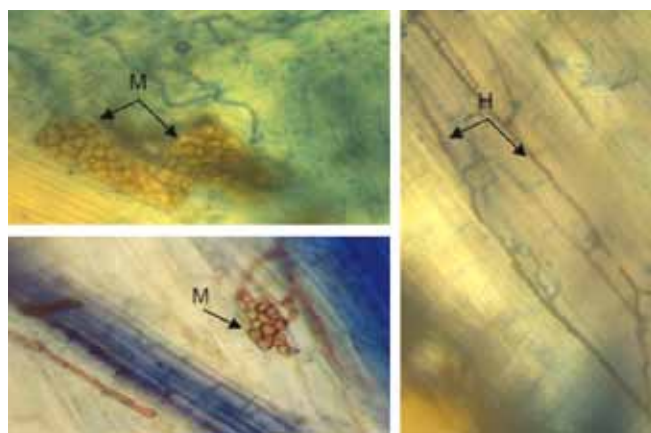
## Considerações finais

A estratégia adotada para o isolamento de fungos DSEF mostrou-se adequada para a obtenção de elevado número de isolados fúngicos geneticamente diferentes, fato que foi comprovado pela análise da região ITS (RIBEIRO et al., 2011). Além disso, a estratégia de armazenamento mostrou-se adequada para a manutenção da coleção por pelo menos doze meses. Por sua vez, a estratégia de reinoculação dos isolados em plantas de arroz e a determinação de colonização das raízes foram eficazes para estudar a capacidade associativa dos isolados fúngicos de arroz.



Fotos: Karen Gonçalves Ribeiro

Fig. 2. Detalhes do desenvolvimento das plantas de arroz da espécie *O. glumaepatula* crescidas em vasos confeccionados a partir de garrafas de vidro (A) ou placas de Petri com 15 cm de diâmetro (B) inoculadas com isolados de dark septate. Plantas com idade de seis semanas.



Fotos: Gilmaria Maria Duarte Pereira

Fig. 3. Estruturas de DSEF em raízes de arroz silvestre *O. glumaepatula*. Microescleródios (M) e Hifas melanizadas septadas observadas em microscópio óptico (H) (aumento de 400X).

## Referências Bibliográficas

- ANDRADE-LINARES, D.; GROSCH, R.; RESTREPO, S.; KRUMBEIN, A.; FRANKEN, P. Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. *Mycorrhiza*, v. 21, n. 5, p. 413-422. 2011.
- APTROOT, A. *Mycosphaerella and its anamorphs 2: conspectus of mycosphaerella*. Nova Dehli, CBS Publishing, 2006. 231 p. (CBS Biodiversity Series, 5).
- BARROW, J. R.; ALTONEN, R. E. A method of evaluating internal colonization of *Atriplexcanescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and how they are influenced by host physiological activity. *Mycorrhiza*, v. 11, p. 199-205, 2001.
- BRUNDRETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Ecological Research*, v. 21, p. 171-313, 1991.

- BUENO, L.; GALLARDO, R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 166-8, 1998.
- CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization *Ofendophytic streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface sterilized banana roots. **FEMS Microbiological Letters**, v. 24, p. 147-152, 2005.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.
- CHEN, X. M.; DONG, H. L.; HU, K. X.; SUN, Z. R.; CHEN, J. A.; GUO, S. X. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 328-337, 2010.
- CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A.; CARNEGIE, A. J.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z. *Metulocladosporiella* gen. nov. for the causal organism of *Cladosporium speckle* disease of banana. **Mycological Research**, v. 110, p. 264-275, 2006.
- L-MORSY, E. M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. **Fungal Diversity**, v. 5, p. 43-54, 2000.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley University of California Press, 1950. 31p.
- JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. **New Phytologist**, v. 140, p. 295-310, 1998.
- MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. **Studies in Mycology**, v. 53, p. 173-189, 2005.
- MÁRQUEZ, M. S. **Estudio de la microbiota endofítica asociada a las gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus***. 2009. 272f. Tese. (Doutorado) - Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Salamanca, Espanha.
- MÁRQUEZ, S. S.; BILLS, G. F.; DOMÍNGUEZ, A. L.; ZABALGOGEAZCOA, I. Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 115-123, 2010.
- NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 06 jun. 2011.
- PEREIRA, G. M. D.; RIBEIRO, K. G.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; VITAL, M. J. S.; KASUYA, M. C. M.; ZILLI, J. E. Ocorrência de fungos endofíticos "dark septate" em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 331-334, 2011.
- PETERSON, L. R.; WAGG, C.; PUTLER, M. Association between microfungus endophytes and roots: do structural features indicate functions? **Botany**, v. 86, p. 445-456, 2008.
- RODRIGUES, E. G.; LIRIO, R. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 159-165, 1992.
- RODRIGUES, R. L. **Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult. F. (Velloziaceae) presentes em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins**. 2010. 70 f. Dissertação. (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.
- SCERVINO, J. M.; GOTTLIEB, A.; SILVANI, V. A.; PERGOLA, M.; FERNANDEZ, L.; GODEAS, A. M. Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigasporarosea*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1753-1756, 2009.
- SILVA, J. C.; FERNANDES, O. C. C.; MARTINS, M. S.; RODRIGUES JÚNIOR, A. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium mantidas* sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 30, p. 48-54, 2010.

WHITE, T. J.; BRUNS, S.; LEE, S.; TAYLOR, J.  
**Amplification and direct sequencing of fungal genes for phylogenetics, PCR protocols: a guide to methods and applications.** San Diego, CA: Academic Press, 1990. p. 315-322.

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

### Comunicado Técnico, 139

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agrobiologia**  
**Endereço:** BR465, km7 - Caixa Postal 74505  
CEP 23851-970 - Seropédica/RJ, Brasil  
**Fone:** (21) 3441-1500  
**Fax:** (21) 2682-1230  
**Home page:** [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)  
**E-mail:** [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)  
**1ª edição**

1ª impressão (2011): 50 exemplares

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



### Comitê de Publicações

**Presidente:** Norma Gouvêa Rumjanek  
**Secretária-Executiva:** Carmelita do Espírito Santo  
**Membros:** Bruno José Rodrigues Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

### Expediente

**Normalização bibliográfica:** Carmelita do Espírito Santo  
**Tratamento das ilustrações:** Maria Christine Saraiva Barbosa  
**Editoração eletrônica:** Marta Maria Gonçalves Bahia