

## Crescimento de fungos *dark septate* em meio de cultura com diferentes fontes de nitrogênio

Carlos Vergara Torres Júnior<sup>1</sup>; Elyakim Alves Ramos Santos<sup>1</sup>; Jerri Édson. Zilli<sup>2</sup>; Krisle da Silva<sup>3</sup>; Gilmara Maria Duarte Pereira<sup>3</sup>; Gustavo R. Xavier<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Embrapa Agrobiologia, [vergaramaputo93@gmail.com](mailto:vergaramaputo93@gmail.com), [alves@oi.com.br](mailto:alves@oi.com.br),

<sup>2</sup> Embrapa Agrobiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, [zilli@cnpab.embrapa.br](mailto:zilli@cnpab.embrapa.br), [gustavo.xavier@embrapa.br](mailto:gustavo.xavier@embrapa.br)

<sup>3</sup> Embrapa Roraima, [Krisle.silva@embrapa.br](mailto:Krisle.silva@embrapa.br); [gmdpereira@hotmail.com](mailto:gmdpereira@hotmail.com)

**RESUMO:** Os fungos endofíticos do tipo *dark septate* (DSEF), podem estabelecer associações mutualísticas com seu hospedeiro, atuando na promoção de crescimento vegetal, principalmente pela facilitação de absorção de nutrientes orgânicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de doze isolados de DSEF crescerem em meio de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio (N). Foi conduzido um ensaio em condições *in vitro*, colocando-se discos de micélio em placas de Petri contendo o meio BDA, meio com solução de hoagland  $\frac{1}{2}$  força iônica agarizada com 1,5% de agar acrescido de 1% de dextrose (SHA), com SHA acrescido de N na forma inorgânica ou orgânica, meio contendo 1% de extrato de *Canavalia ensiformis* (L.) acrescido de 1,5% de agar (EV1%), com EV1% acrescido de N na forma inorgânica ou orgânica. As placas foram incubadas a 28 °C por até 12 dias. Foram utilizadas como fonte de N na forma orgânica e inorgânica, a glicina e nitrato de amônio. O isolado ERR 04 desenvolveu-se melhor no meio EV1% e no meio com SHA, ambos acrescidos de glicina. O isolado ERR 02 utilizou melhor o meio com SHA acrescida de nitrato de amônio ou de glicina, comparativamente aos demais isolados. Os isolados ERR 02 e ERR 04 podem estar utilizando as fontes N orgânicas. A presença de qualquer das fontes de N no meio de cultivo parece não trazer benefícios no crescimento dos demais isolados.

**Termos de indexação:** DSEF, glicina, nitrato de amônio.

### 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 nas células do córtex do vegetal (SIEBER, 2002 apud YUAN *et al*, 2010). Os DSEF podem 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 (CHEN *et al.*, 2010), inclusive pela hidrólise de compostos orgânicos complexos, para a liberação destes nutrientes (MANDYAM; JUMPPONEN, 2005). Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de doze isolados de DSEF crescerem em meio de cultura contendo diferentes fontes N.

### MATERIAL E MÉTODOS

Um ensaio foi conduzido em condições *in vitro* para avaliar a capacidade de uso de diferentes fontes de nitrogênio por doze isolados de DSEF obtidos de plantas de *Oryza glumaepatula* (RIBEIRO, 2011). Os isolados foram previamente crescidos em placas de Petri contendo o meio Ágar-batata-dextrose (BDA) a 28 °C por sete dias. Em seguida foram colocados discos de micélios (6 mm de diâmetro) no centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA, solução de hoagland  $\frac{1}{2}$  força iônica agarizada com 1,5% de agar acrescido de 1% de dextrose (SHA), SHA acrescida de N na forma inorgânica, utilizando-se como fonte de N o nitrato de amônio (SHA + NI), SHA acrescido de N na forma orgânica, utilizando-se a glicina como fonte de N (SHA + aa), 1 % de extrato de *Canavalia ensiformis* (L.) acrescido de 1,5% de agar (EV1%), EV1% acrescido de N na forma inorgânica, utilizando-se como fonte de N na forma de nitrato de amônio (EV1% + NI), EV1% acrescido de N na forma orgânica, utilizando-se a glicina como fonte de N (EV1% +aa). Essas placas foram incubadas a 28 °C por até 12 dias. O extrato de vegetal foi obtido pela moagem da parte aérea seca (por 72h; 65 °C) e esterilização através de irradiação com raios gama (dose de 25 kgy). A glicina foi adicionada aos diferentes meios, quando os mesmos estavam com temperatura de 35-40 °C, sendo necessária uma filtração prévia em Millipore para a sua adição. A proporção de N utilizada foi de 0,3%. Foram realizadas observações aos 12 dias após a



inoculação dos fungos, medindo-se o diâmetro das colônias fúngicas através de um paquímetro digital e aos doze dias foi determinado o peso fresco da colônia fúngica. Os dados foram submetidos à análise de variância. O agrupamento de média foi feito utilizando o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos doze dias no meio BDA, os isolados ERR 04 e ERR 42 foram os que apresentaram o menor diâmetro micelial, menor velocidade de crescimento e maior massa da colônia, em relação aos demais (Tabela 1). No meio de cultura utilizando o extrato de *Canavalia ensiformis* (L.), solução de hoagland agarizada a 1,5% e acrescida de 1% de manitol (SHA) e na SHA acrescida de glicina, o isolado ERR 04 apresentou menor diâmetro micelial, menor velocidade de crescimento e maior massa da colônia aos doze dias (Tabela 1). Entretanto na SHA acrescida de nitrato de amônio ou glicina como fontes de nitrogênio, os isolados mostraram um comportamento um pouco diferenciado. Aos doze dias na SHA acrescida de nitrato de amônio ou de glicina, o isolado ERR 02 apresentou diâmetro micelial e velocidade de crescimento que pode ser considerado intermediário e maior massa da colônia, em relação aos demais (Tabela 1). Esses resultados indicaram que o isolado ERR04 utilizou melhor o extrato vegetal de *Canavalia ensiformis* (L.) e SHA acrescida de glicina e que o isolado ERR 02 utilizou melhor a SHA acrescida de nitrato de amônio ou de glicina, comparativamente aos demais isolados. A presença de qualquer das fontes de N parece não trazer benefícios no crescimento dos demais isolados. O trabalho sugere ainda a avaliação de diâmetro, velocidade e massa da colônia de isolados *dark septate* para a melhor interpretação da capacidade do uso de nutrientes presentes num determinado meio de cultura, apesar da dificuldade de separação da colônia do meio de cultura para a determinação da sua massa. O fato dos DSEF produzirem uma variedade de enzimas extracelulares nos indica que estes apresentam potencial para acessar fontes complexas e transferir ao seu hospedeiro nutrientes essenciais como carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) (MANDYAN, 2008). Os mecanismos para essa transferência de nutrientes podem ser semelhantes aos observados nas interações micorrízicas, onde hifas fúngicas absorvem N orgânico, como aminoácidos e pequenos peptídeos, bem como N

inorgânico do solo e transferem as plantas através da interface fungo-planta (RIBEIRO, 2011). O estudo abre possibilidade de testes de avaliação da transferência de nutrientes diretamente da matéria orgânica para os vegetais mediada pelos fungos

## CONCLUSÕES

O isolado ERR 04 utiliza melhor o extrato vegetal de *canavalia ensiformis* (L.) e SHA acrescido de glicina comparativamente aos demais isolados.

O isolado ERR 02 utiliza melhor a SHA acrescida de nitrato de amônio ou de glicina, comparativamente aos demais isolados.

## AGRADECIMENTOS

A UFRRJ e Embrapa Agrobiologia pela realização do trabalho e a Capes pela bolsa de mestrado.

## REFERÊNCIAS

- 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, n.5, p. 94–101, abr., 2010.
- 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, n.3, p.328-337.
- MANDYAM, K. **Dark septate fungal endophytes from a tallgrass prairie and their continuum of interactions with host plants**. Manhattan, 2008. 115f. Dissertation (Doctor of philosophy) - Division of Biology, College of Arts and Sciences, Kansas State University.
- RIBEIRO, K. G. **Fungos endofíticos dark septates em arroz silvestre *oryza glumaepatula* Steund**. Boa Vista, 2011. 68p. Dissertação (mestrado em Recursos Naturais)- Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, Roraima. JACKSON, M. L. Chemical composition of soil. In: BEAR, F. E., ed. *Chemistry of the soil*. 2.ed. New York: Reinhold, 1964. p.71-141.

**Tabela 1** – Massa da colônia, diâmetro micelial e velocidade de crescimento de isolados fúngicos do tipo *dark septate*, crescidos em meios de cultura com diferentes fontes de nitrogênio até aos 12 dias após a inoculação.

Meio de cultura	ERR 02	ERR 04	ERR 16	ERR 26	ERR 31	ERR 32	ERR 33	ERR 42	ERR 43	ERR 44	ERR 45	ERR 46
<b>Massa da colônia fúngica (g)</b>												
BDA	1,84 Ac	2,37 Aa	1,98 Ab	1,42 Ad	2,21 Aa	2,01 Ab	1,79 Ac	2,40 Aa	1,36 Ad	1,87 Ac	1,72 Ac	2,01 Ab
SHA	0,06 Cb	0,95 Da	0,04 Bb	0,10 Bb	0,09 Bb	0,04 Bb	0,09 Bb	0,05 Bb	0,06 Bb	0,05 Cb	0,04 Bb	0,05 Db
SHA+NI	1,27 Ba	0,86 Db	0,09 Bc	0,16 Bc	0,23 Bc	0,11 Bc	0,18 Bc	0,13 Bc	0,15 Bc	1,33 Ba	0,12 Bc	0,84 Bb
SHA +aa	1,40 Ba	1,14 Ca	0,11 Bc	0,18 Bc	0,19 Bc	0,18 Bc	0,21 Bc	0,09 Bc	0,17 Bc	0,04 Cc	0,11 Bc	0,71 Bb
EV1%	0,29 Cb	1,47 Ca	0,09 Bb	0,09 Bb	0,21 Bb	0,05 Bb	0,09 Bb	0,11 Bb	0,08 Bb	0,23 Cb	0,09 Bb	0,46 Cb
EV1% + NI	0,53 Cc	1,69 Ba	0,08 Bc	0,10 Bc	0,11 Bc	0,05 Bc	0,10 Bc	0,06 Bc	0,05 Bc	0,17 Cc	0,12 Bc	1,04 Bb
EV1% + aa	0,35 Cc	1,21 Ca	0,27 Bc	0,22 Bc	0,25 Bc	0,10 Bc	0,34 Bc	0,27 Bc	0,06 Bc	0,04 Cc	0,11 Bc	0,82 Bb
CV(%)	40,07											
<b>Diâmetro micelial (mm)</b>												
BDA	51,8Aa	38,8Ac	50,9Ba	46,2Bb	49,2Ba	48,9Ca	46,0Bb	40,7Bc	51,9Ba	50,7Ba	49,7Ba	45,8Cb
SHA	52,4Ab	36,6Ac	60,8Aa	54,0Bb								
SHA+NI	50,6Ab	26,9Bc	53,1Bb	60,8Aa	60,8Aa	54,3Bb	60,8Aa	60,8Aa	52,0Bb	60,8Aa	52,9Bb	60,8Aa
SHA +aa	53,3Ab	39,2Bc	55,6Bb	60,8Aa	60,8Aa	55,8Bb	60,8Aa	60,8Aa	55,1Bb	60,8Aa	53,2Bb	60,8Aa
EV1%	43,7Bb	38,8Bc	60,8Aa	60,8Aa	41,8Cb	60,8Aa						
EV1%+NI	45,2Bb	39,6Bc	60,8Aa	60,8Aa	46,8Bb	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	48,9Bb	60,8Aa	60,8Aa
EV1%+aa	41,5Bc	34,7Bd	60,8Aa	60,8Aa	41,8Cc	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	50,7Bb	51,9Bb	53,8Bb
CV (%)	4,42											
<b>Velocidade de crescimento (mm dia<sup>-1</sup>)</b>												
BDA	3,8Ab	2,7Ac	3,7Ba	3,3Ba	3,6Bb	3,6Ca	3,3Bb	2,9Bc	3,8Ba	3,7Ba	3,6Bc	3,3Cb
SHA	3,9Ab	2,6Ac	4,6Aa	4,0Bb	4,6Aa							
SHA+NI	3,7Ab	1,7Bc	3,9Bb	4,6Aa	4,6Aa	4,0Bb	4,6Aa	4,6Aa	3,8Bb	4,6Aa	3,9Bb	4,6Aa
SHA +aa	3,9Ab	2,8Ac	4,1Bb	4,6Aa	4,6Aa	4,2Bb	4,6Aa	4,6Aa	4,1Bb	4,6Aa	3,9Bb	4,6Aa
EV1%	3,1Bb	2,7Ac	4,6Aa	4,6Aa	3,0Cb	4,6Aa						
EV1%+NI	3,3Bb	2,8Ac	4,6Aa	4,6Aa	3,4Bb	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	3,6Bb	4,6Aa	4,6Aa
EV1%+aa	3,0Bc	2,4Ad	4,6Aa	4,6Aa	3,0Cc	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	3,7Bb	3,8Bb	4,0Bb
CV (%)	4,97											

Letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. BDA (batata – Dextrose – Agar); SHA: solução de hoagland agarizada com 1,5% de agar + 1% de dextrose; SHA+NI: solução de hoagland agarizada com 1,5% de Agar + 1% de dextrose + 0,3 % de N na forma de nitrato de amônio; SHA + aa: solução de hoagland agarizada com 1,5% agar + 1% de dextrose + 0,3 % de N na forma da glicina; EV1%: 1,5% de Agar + 1% de Extrato vegetal de *Canavalia ensiformis* (L.) (feijão de porco); EV1% + NI: 1,5% de Agar + 1% de Extrato vegetal de feijão de porco + 0,3 % de N na forma de nitrato de amônio; EV1% + aa: 1,5% de Agar + 1% de Extrato vegetal de feijão de porco + 0,3 % de N na forma da glicina.