**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos dark septate em áreas de
Mata Atlântica em um gradiente altitudinal**

Joice Andrade Bonfim

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas

**Piracicaba
2015**

Joice Andrade Bonfim
Engenheira Agrônoma

**Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos dark septate em áreas de Mata Atlântica
em um gradiente altitudinal**

Orientadora:

Profa. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Bonfim, Joice Andrade

Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos dark septate em áreas de Mata Atlântica em um gradiente altitudinal / Joice Andrade Bonfim. - - Piracicaba, 2015.
146 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Micorrizas 2. Esporos 3. Taxonomia 4. Ascomycetos 5. Diversidade I. Título

CDD 589.23
B695f

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus, a meus familiares e aos amigos

OFEREÇO.

A meus pais, José Luiz e Maria,

A meus irmãos, Juarez, Jerry e Jorge (*in memoriam*),

A minha sobrinha, Melissa

Aos apaixonados por micorrizas

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é tudo na minha vida e que tornou possível a realização desse trabalho, me dando força, coragem e ânimo para ir até o fim.

Aos meus pais José Luiz e Maria por estarem sempre do meu lado me apoiando e me dando toda força e amor necessários para continuar minha caminhada e por terem suportado a minha ausência todo esse tempo.

À minha orientadora e amiga Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso por ter acreditado no meu trabalho, pelos ensinamentos, carinho e paciência.

Ao pesquisador e amigo Dr. Fritz Oehl, pela ajuda na identificação dos fungos micorrízicos, revisão do artigo, e por ter contribuído para minha agradável experiência na Suíça.

Ao pesquisador e professor Dr. Thomas N. Sieber do Instituto Federal de Tecnologia de Zurique, pela ajuda na identificação dos fungos dark septate e por revisar o artigo.

Ao professor Fernando D. Andreote pela amizade e conselhos.

Aos professores doutores Carlos Eduardo Pellegrini Cerri, Paulo Sérgio Pavinato e Marcio Rodrigues Lambais, avaliadores do exame de qualificação, pelas contribuições no trabalho.

Ao pesquisador Dr. Rafael Vasconcellos pela ajuda nas análises estatísticas multivariadas e revisão dos artigos.

A Denise Mescolotti, Sônia Pires e Fernando Baldesin pela ajuda, carinho e pelo cuidado de verdadeiros pais.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia do Solo: Maielle, Nicolle, Felipe e Lara pela amizade e ajuda com as análises e em especial a Laura pela ajuda na condução do experimento na casa de vegetação.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Microbiologia do Solo: Armando Cavalcante, Ademir Durrer, Cristiane Alcântara, Daniel Bini, Danielle Gonçalves, Diogo Costa, German Estrada, Jamil Pereira, Júlia Elídia, Maurício Zagatto, Mylenne Pinheiro, Paulo Roger, Pedro Andrade, Pilar Mariani, Simone Cotta, Tâmara Messias e, em especial, a Thiago Gumiere e Arthur Prudêncio pela ajuda na realização da clonagem dos FMA e Sílvia Barrera pela ajuda nas análises filogenéticas.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência do Solo, em especial Dorival pela ajuda nas coletas.

A toda equipe do projeto Biota Gradiente Funcional, em especial Renato Belinello (Pezão), Maíra Padgurschi e Cínthia Silva, pela ajuda nas coletas.

A minhas amigas Améris Ferreira, Astrid Cataline e Karina Cardoso pela amizade de verdadeiras irmãs.

Aos meus irmãos Jerry e Juarez pela amizade e por não medirem esforços para me ajudar.

A toda a minha família, avô, avós, tios, tias, primos e primas (os Andrade e os Bonfim).

A meus colegas de pós-graduação: Roberta, Sâmala, Sílvia, Elisa, Dorotéia, Alice, Joseane, Thalita, Carol, Sabrina, Anderson, Flávio pela amizade e em especial Fábio pela ajuda nas análises de P.

Aos órgãos de apoio à pesquisa, CNPq e Fapesp, pelo apoio financeiro, tornando possível a execução desse trabalho

Enfim, meu muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança
brincando à beira-mar, divertindo-me em
descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma
concha mais bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua misterioso
diante de meus olhos”.*

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
Referências	23
2 OCORRÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE EM ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA EM UM GRADIENTE ALTITUDINAL	29
Resumo	29
Abstract.....	29
2.1 Introdução.....	30
2.2 Desenvolvimento.....	32
2.2.1 Material e Métodos	32
2.2.2 Resultados	38
2.2.3 Discussão	47
2.3 Conclusões	51
Referências	52
3 DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO RIZOSFÉRICO E EM RAÍZES DE ÁRVORES DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA EM UM GRADIENTE ALTITUDINAL.....	59
Resumo	59
Abstract.....	59
3.1 Introdução.....	60
3.2 Desenvolvimento.....	62
3.2.1 Material e Métodos	62
3.2.2 Resultados	67
3.2.3 Discussão	79
3.3 Conclusões	84
Referências	85
4 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE EM ÁRVORES DA MATA ALÂNCTICA BRASILEIRA EM UM GRADIENTE ALTITUDINAL	93
Resumo	93

Abstract	93
4.1 Introdução	94
4.2 Desenvolvimento	96
4.2.1 Material e Métodos	96
4.2.2 Resultados	99
4.2.3 Discussão	106
4.3 Conclusões	111
Referências.....	111
5 INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICO DARK SEPTATE E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM PLANTAS DE ARROZ (<i>Oriza sativa</i>)	117
Resumo.....	117
Abstract	117
5.1 Introdução	118
5.2 Desenvolvimento	119
5.2.1 Material e Métodos	119
5.2.2 Resultados	122
5.2.3 Discussão	125
5.3 Conclusões	127
Referências.....	128
6 CONCLUSÕES GERAIS	131
APÊNDICES.....	135
ANEXOS	139

RESUMO

Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos dark septate em áreas de Mata Atlântica em um gradiente altitudinal

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm papel fundamental na absorção de nutrientes, sobrevivência vegetal e na estruturação dos solos. Recentemente uma série de pesquisadores verificou que plantas associadas com FMA também podem se associar com os fungos de micélio escuro (DSE do inglês, *dark septate endophytes*). Embora de estudo recente, já se observou que os endófitos de micélio escuro igualmente podem promover o crescimento de plantas em diversos ambientes. O objetivo desse trabalho é realizar um levantamento de espécies de FMA e DSE em áreas de Mata Atlântica em um gradiente altitudinal, podendo advir respostas de relevância ecológica maior, como a influência da planta hospedeira, dos parâmetros do solo, da sazonalidade e da altitude sobre a ocorrência e diversidade desses fungos. Espera-se também esclarecer melhor a lacuna existente no conhecimento dos benefícios dos DSE para as plantas e dar o primeiro passo para a compreensão da interação dos FMA com os DSE. Avaliaram-se os atributos químicos, físicos e microbiológicos do solo e, entre estes, a ocorrência e diversidade dos FMA e DSE na raiz e solo rizosférico de diferentes espécies arbóreas da Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil, em um gradiente altitudinal: 80m, 600m e 1000m. As coletas de solo e raízes foram realizadas em quatro estações. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, teste LSD, análise canônica discriminante (ACD) e análise de redundância (RDA). Uma vez que muitas espécies de DSE são conhecidas por serem patogênicas sobre certas plantas, os isolados de DSE foram avaliados quanto à sua eventual patogenicidade. Os isolados não patogênicos foram selecionados para um bio-teste, sozinhos ou em combinação com um FMA em plantas de arroz. Foram identificadas no solo rizosférico 58 espécies de FMA e os gêneros *Acaulospora* e *Glomus* foram dominantes, enquanto que nas raízes, apenas 14 grupos de FMA foram encontrados e todos apresentaram elevada similaridade com a família Glomeraceae. Foram encontrados 251 isolados de DSE que se agruparam em 35 UTO. A maioria dos isolados de DSE foram patogênicos para as plantas de arroz. A época de amostragem teve efeito sobre a colonização radicular e diversidade dos FMA. A altitude foi importante em selecionar espécies de FMA e também agiu sobre o número de esporos e colonização por DSE e FMA. A maioria dos FMA e DSE ocorreu de forma generalizada nas diferentes espécies hospedeiras, apesar de existirem algumas espécies fúngicas com preferências para certas árvores. Os atributos do solo tiveram forte influência sobre a colonização pelos FMA, enquanto que para os DSE as diferenças na colonização foram pouco influenciadas pelos parâmetros do solo. No entanto, as propriedades do solo foram responsáveis por dirigir a ocorrência de certas espécies de FMA e DSE. A interação entre FMA e DSE e os seus benefícios para as plantas hospedeiras ainda necessita de maiores estudos principalmente com relação a compreensão das condições fornecidas em experimentos que favoreçam ambas as associações.

Palavras-chave: Micorrizas; Esporos; Taxonomia; Ascomicetos; Diversidade

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes in areas of Atlantic Forest in altitudinal gradient

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a fundamental role in the absorption of nutrients, plant survival and soil structure. Recently a number of researchers found that plants associated with AMF may also be associated with dark mycelium fungi. In a recent study, it was observed that the dark septate endophytes (DSE), usually Ascomycetes, can promote the growth of plants in different environments. The aim of this study was to survey the diversity of AMF and DSE in Atlantic Forest areas in altitudinal gradients, which result in responses of greater ecological relevance, as the influence of the host plant, soil attributes, seasonality and altitude on occurrence and diversity of these fungi. We also expect to clarify the gap in the knowledge of the benefits of DSE for plants and take the first step towards the comprehension of the interaction of AMF and DSE. We evaluated the chemical, physical and microbiological attributes, and among these, the occurrence and diversity of AMF and DSE in the root and rhizospheric soil of different tree species of the Atlantic Forest of Serra do Mar State Park, State of Sao Paulo, Brazil, along an altitudinal gradient: 80m, 600m and 1000m. Samplings of the soil and roots were performed in four seasons. The data were submitted to ANOVA, LSD test, canonical discriminant analysis (CDA) and redundancy discriminant analysis (RDA). Since many species of DSE are known to be pathogenic on certain plants, DSE fungal isolates were evaluated for their eventual pathogenic activity. The isolates non-pathogenic were used in a bio-test to either alone or in combination with the AMF in rice plants. In the rhizosphere 58 AMF species were identified. The genera *Acaulospora* and *Glomus* were predominant. However, in the roots, only 14 AMF sequences were found and all had high similarity to the family Glomeraceae. In an analysis of the DNA ITS sequences of the 251 DSE isolates we found that they clustered into 35 UTOs. Most DSE found were considered pathogenic for rice. The season had no effect on root colonization and AMF diversity. Altitude was important in selecting AMF species and also acted on the number of spores and colonization by AMF and DSE. Most of the AMF and DSE were generalists, without a specificity for host plants, although there are some fungal species with preferences for certain trees. The soil properties had a strong influence on colonization by AMF while, for the DSE, differences in colonization do not seem to be related to soil attributes. However, soil attributes were responsible for directing the diversity of AMF and also of DSE species. The interaction between AMF and DSE and their benefits to the host plants require further studies to comprehend the conditions that favor both associations.

Keywords: Mycorrhiza; Spores; Taxonomy; Ascomycetes; Diversity

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FMA - fungo micorrízico arbuscular

DSE – fungo endofítico dark septate

E – área com altitude de 80m acima do nível do mar

Q - área com altitude de 600m acima do nível do mar

K - área com altitude de 1000m acima do nível do mar

C-CO₂ - Respiração Basal do Solo

CBM - Carbono da Biomassa Microbiana

qCO₂ - Quociente metabólico

MO – Matéria Orgânica do Solo

P - Fósforo disponível

Ca²⁺ - Cálcio trocável

Mg²⁺ - Magnésio trocável

K⁺ - Potássio trocável

CTC - Capacidade de troca catiônica do solo

H - Índice de diversidade de Shannon

LSD - Least Significant Difference

RDA - Análise de redundância

ACD - Análise canônica discriminante

CCP - Coeficiente canônico padronizado

TDP - Taxa de discriminação paralela

BLAST - Basic local alignment search tool (Ferramenta básica de busca de alinhamentos locais)

ITS - Internal transcribed spacer (Espaçador interno transcrito)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

SOC - Meio super ótimo com repressão de catabólitos

LB - Meio Luria-Bertani

AEM - Meio ágar e extrato de malte

1 INTRODUÇÃO

O bioma Mata Atlântica é um hotspot de biodiversidade e encontra-se distribuído ao longo de 17 estados brasileiros, além de Paraguai e Argentina. No Brasil, a área de Mata Atlântica originalmente era de 148 milhões de hectares e se estendia por mais de 3.300 km ao longo da costa leste entre as latitudes de 5° S e 30° S (JOLY et al., 2012). Entretanto, com o processo intensivo de retirada da cobertura vegetal, visando à utilização da área para agricultura, pecuária, extração madeireira e ocupação humana, hoje os remanescentes representam apenas 16% da área original (RIBEIRO et al., 2009). No estado de São Paulo, no sudeste do Brasil, a Mata Atlântica cobria mais de 82% de seu território mas atualmente restam apenas 7% da distribuição original (DOSSIÊ MATA ATLÂNTICA, 2001). Com o intenso desmatamento a Mata Atlântica atualmente é considerada um dos biomas mais ameaçados do planeta (COLOMBO; JOLY, 2010; JOLY et al., 2012).

A porção de Mata Atlântica situada ao longo da costa da Serra do Mar, no litoral norte do estado de São Paulo, em uma curta distância, apresenta fisionomias e composições distintas, que variam principalmente devido à mudança abrupta de altitude. O gradiente altitudinal formado propicia diferenças climáticas importantes no ambiente, como, por exemplo, decréscimo na temperatura do ar, aumento na nebulosidade em maiores altitudes e, conseqüentemente, diferenças na radiação solar incidente e alterações nas propriedades dos solos entre outros fatores (MARTINS, 2010; JOLY et al., 2012). Essas mudanças poderão selecionar os micro-organismos ali presentes, com grandes efeitos na distribuição e diversidade no solo, principalmente para aqueles que estão associados com as plantas.

Dentre as associações simbióticas existentes, a simbiose micorrízica arbuscular é a mais comum nos ecossistemas naturais e agrícolas. Praticamente 80% das plantas vasculares estabelecem associação com os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (SCHÜSSLER et al., 2001; WANG; QIU, 2006). As plantas que não formam esse tipo de associação provavelmente perderam essa característica durante a história evolutiva, evoluindo para outro tipo de micorriza, como as ectomicorrizas, micorrizas orquidóides ou ericóides, ou apenas perderam a capacidade de formar qualquer tipo de associação micorrízica (BRUNDRETT, 2009).

Os FMA são Glomeromycetos e podem compor de 5% a 50% da biomassa dos micro-organismos do solo (OLSSON et al., 1999). Estes fungos, de crescimento filamentoso, produzem uma malha de hifas extensa, ramificada (pode atingir dezenas de metros de comprimento por grama de solo) e extremamente fina ($< 2 \mu\text{m}$ de diâmetro), que é capaz de se

expandir para mais de 15cm de distância da superfície da raiz e explorar volumes do solo inatingíveis por estruturas radiculares (CARDOSO et al., 2010). Dessa forma, a simbiose micorrízica tem um importante papel na absorção de nutrientes minerais pelas plantas, principalmente o P, e outros elementos pouco móveis no solo, bem como na transferência de carbono fixado pela planta para o fungo (SMITH; READ, 2008; VAN DER HEIJDEN et al., 2010).

A planta em associação com o FMA apresenta um melhor desenvolvimento, torna-se mais bem nutrida e passa a apresentar maior tolerância a estresses bióticos e abióticos (SMITH; READ, 2008; CARDOSO et al., 2010). Além disso, a associação micorrízica traz melhorias para as propriedades físicas do solo, uma vez que o micélio externo é responsável pela exsudação de glicoproteínas hidrofóbicas chamadas glomalinas, envolvidas na cimentação das partículas do solo e consequentemente agindo diretamente na formação de agregados estáveis e armazenamento de carbono no solo (RILLIG, 2004).

Além da colonização pelo FMA, mais de 600 espécies de plantas (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998) são frequentemente colonizadas por fungos com hifas de pigmento escuro, denominados endófitos de micélio escuro, DSE (do inglês, *dark septate endophytes*), com função ainda não totalmente conhecida para as plantas. Os DSE em sua maioria são classificados como Ascomicetos conidiais que apresentam hifas septadas e colonizam as células das raízes das plantas (JUMPPONEN, 2001). A colonização pelos DSE difere morfológicamente da simbiose micorrízica convencional e é identificada principalmente pelas suas hifas escuras e pigmentadas e microescleródios que se formam inter e intracelularmente dentro do córtex. A cor escura do micélio resulta da incorporação de melanina, um pigmento escuro natural (GRÜNIG et al., 2011).

Os efeitos dos DSE para seus hospedeiros ainda não estão bem elucidados. Alguns pesquisadores consideram que os DSE possuem a mesma função de outros fungos formadores de micorrizas (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; JUMPPONEN et al., 2001; ADDY et al., 2005). Recentemente, um estudo em meta-análise de um limitado número de pesquisas disponíveis sugeriu que os DSE contribuem para aumentar a biomassa e o conteúdo de P e N das plantas, principalmente quando o N é fornecido na forma orgânica (NEWSHAM, 2011). Além do efeito nutricional, os DSE conferem à planta proteção contra patógenos (RODRIGUEZ et al., 2009; REININGER; SIEBER, 2012) e adaptação às condições extremas do solo (SCHMIDT et al., 2008), tais como solos contaminados por metais pesados (BAN et al., 2012; ZHAO et al., 2015), com estresse hídrico (KNAPP et al., 2012) e salino (WALLER et al., 2005) e com elevado teor de acidez (POSTMA et al., 2007). Também foi observado que

os DSE podem coexistir com fungos micorrízicos arbusculares e produzir metabólitos capazes de aumentar a germinação, o crescimento e a ramificação de hifas desses fungos, beneficiando a planta hospedeira de forma indireta (SCERVINO et al., 2009). Entretanto, outras evidências indicam que estes fungos também podem ter efeitos neutros ou negativos sobre o crescimento de seus hospedeiros (JUMPPONEN, 2001; SARAVESI et al., 2014).

Embora os DSE, em alguns casos, ofereçam benefícios para as plantas, o mecanismo por meio do qual isto ocorre ainda não está tão bem elucidado, ao contrário do que acontece para os FMA. Alguns autores argumentam que a ausência de determinadas características citológicas na associação dos DSE na raiz, que são normalmente desenvolvidas pelo fungo micorrízico, deixa dúvidas sobre a ocorrência de troca de nutrientes entre os DSE e as plantas (PETERSON et al., 2008; MANDYAM; JUMPPONEN, 2015). Entretanto, por serem encontrados em todas as partes do sistema radicular, enquanto os FMA normalmente são confinados às raízes primárias não-lignificadas (GRÜNIG, 2011), as interações dos DSE com seu hospedeiro são consideradas, pelo menos, tão significativa quanto aquelas com fungos micorrízicos. Além disso, ao contrário do FMA, os DSE não têm uma interação de dependência com as plantas, pois podem completar seu ciclo de vida na ausência da planta hospedeira.

No Brasil, estudos de diversidade dos FMA e principalmente dos DSE, devido a inexistência de estudos nessa área, são de grande prioridade, especialmente quando são conduzidos em ambiente com acelerada devastação e que possivelmente abriga espécies de fungos ainda não descritas pela ciência. Estudos sobre a diversidade dos FMA na Mata Atlântica são comuns, entretanto, nenhum estudo foi ainda desenvolvido ao longo de um gradiente altitudinal visando compreender se a diversidade desses fungos é influenciada pela variação da altitude, que está associada a uma série de mudanças no ambiente.

A diversidade de espécies de FMA é estudada em todo o mundo e baseia-se em estudos morfológicos e moleculares. Por produzirem esporos com características únicas dentro do Reino Fungi (denominados glomerosporos), é possível realizar a caracterização morfológica dos FMA levando em consideração as estruturas e formação das paredes dos esporos e suas camadas, estrutura de germinação e forma de emergência do tubo germinativo, tamanho, forma, cor, tipo dos esporos, entre outras (DE SOUZA et al., 2010; OEHL et al., 2011; BLASZKOWSKI, 2012). Já a caracterização molecular, com uso de um vasto número de protocolos, é baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polimerase Chain Reaction*, em inglês), e tem sido a única ferramenta disponível atualmente para identificação de espécies de FMA nas raízes das plantas hospedeiras, de uma forma rápida e com excelente

grau de confiança (ÖPIK et al., 2013). Atualmente, os FMA encontram-se classificados em cinco ordens: Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales, Gigasporales e Paraglomerales, 15 famílias e 38 gêneros, com pouco mais de 270 espécies descritas (GOTO, 2014). No Brasil, já foram relatadas 119 espécies de FMA e apenas 78 foram encontradas em áreas de Mata Atlântica (ZANGARO; MOREIRA, 2010).

Para os DSE, apesar de serem conhecidos desde o início do século XX, poucas espécies foram identificadas até o momento. Isso ocorre pelas dificuldades em sua classificação, pois a maioria das espécies não produz estruturas reprodutivas em meio de cultivo, assim a identificação morfológica é complicada e, muitas vezes, é baseada em critérios bastante amplos e ambíguos. O uso de métodos moleculares vem sendo uma ferramenta muito empregada na identificação das espécies de DSE, pois permite uma comparação das sequências de DNA de DSE desconhecidos com aquelas com sequências de nucleotídeos conhecidas, disponíveis nos bancos de dados, e assim a identificação torna-se mais confiável (GRÜNING et al., 2011). Os DSE apresentam ampla distribuição e incluem espécies de fungos comuns do solo como saprofíticos, simbióticos, bem como patogênicos (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; ADDY et al., 2005; MANDYAM; JUMPPONEN, 2008). A maioria dos DSE pertence às ordens: Helotiales, Pleosporales, Sordariales e Pezizales (GRÜNING et al., 2011) e os principais gêneros encontrados são: *Microdochium* [anamórfico de *Monographella* (Xylariales)], *Periconia* (anamórfico de Pleosporales), *Harpophora* (anamórfico de Gaeumannomyces), *Cadophora* (anamórfico de Helotiales), *Cryptosporiopsis* [anamórfico de *Pezicula* (Helotiales)], *Phialocephala* e *Acephala* (ambos anamórfico de Helotiales) (ADDY et al., 2005; SIEBER; GRÜNING, 2013). As espécies *Phialocephala fortinii* e *Acephala applanata* são consideradas as mais abundantes em florestas e em ecossistemas alpinos no hemisfério norte e por isto são as mais estudadas (SIEBER; GRÜNING, 2006), enquanto que a identificação e função ecológica da maioria dos táxons de DSE ainda são desconhecidas.

No Brasil, poucos trabalhos foram publicados relatando a ocorrência dos DSE e este é o primeiro estudo que avalia a diversidade deste grupo de fungos. Até o presente momento, também nada se sabe sobre a ocorrência de DSE em associação com espécies arbóreas da Mata Atlântica. Por enquanto, a presença dos DSE só foi verificada em algumas espécies arbóreas e herbáceas, em área de cerrado em Minas Gerais (DETMANN et al., 2008; SANTOS et al., 2013), espécies aquáticas, coletadas na Bacia do Rio Paraná (MARINS et al., 2009), em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia (PEREIRA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011) e em raízes de 29 espécies de ervas daninhas (MASSENSINI et al., 2014).

A distribuição da maioria dos fungos simbiotes de plantas em diferentes locais pode ser parcialmente explicada por fatores ambientais, tais como a altitude (RANELLI et al., 2015), tipo de solo (OEHL et al., 2010), comunidade vegetal (ÖPIK et al., 2009) e estação do ano (MANDYAM; JUMPPONEN, 2008). Um estudo mais detalhado desses fatores e da maneira pela qual influenciam a ocorrência e a diversidade dos FMA e DSE no ambiente é necessário para elucidar futuras pesquisas relacionadas à conservação e restauração das florestas.

O comportamento sazonal dos FMA é frequentemente estudado em diferentes habitats, entretanto, ainda existem muitos resultados contraditórios e muitas suposições com relação a esse tema na literatura, que muitas vezes são relacionadas com a umidade de cada solo, a combinação da intensidade e duração do comprimento do dia, bem como acontece com as espécies de FMA presentes (ENTRY et al., 2002; OEHL et al., 2009; MOREIRA et al., 2007; BONFIM et al., 2013). Quanto ao DSE ainda se conhece muito pouco sobre a influência da sazonalidade na sua ocorrência e diversidade e a maioria dos estudos considera apenas o grau de colonização. Enquanto alguns autores não encontraram nenhum padrão sazonal para colonização com DSE (RUOTSALAINEN et al., 2002), outros mostram que os DSE também são sensíveis à variação sazonal (LI et al., 2005; MANDYAM; JUMPPONEN, 2008).

A variação altitudinal, apesar de pouco estudada, tem sido considerada um importante fator para modular as características ecológicas da Floresta Tropical, com efeitos na distribuição de muitos organismos (GÓMEZ et al., 2012; JOLY et al., 2012). Juntamente com a alteração da altitude ocorre uma série de mudanças no ambiente, tais como: distribuição das espécies de plantas, características do solo, pressão atmosférica, pressão parcial de O₂ e CO₂, redução da temperatura atmosférica, entre outros fatores (KÖRNER et al., 2007; LUGO et al., 2012; MARTINS, 2010). Globalmente, ocorre um declínio médio de temperatura de 0,6-1,0°C por cada 100m de elevação (RUOTSALAINEN et al., 2004). Estas e outras mudanças são responsáveis por dirigir a distribuição de diferentes fungos, seja ele um FMA ou DSE (RANELLI et al., 2015). Segundo alguns autores, em altitudes maiores que 1000m, fica evidente a diminuição na ocorrência ou até mesmo ausência dos FMA e uma maior abundância dos DSE (RUOTSALAINEN et al., 2004; SCHMIDT et al., 2008; ZUBEK et al., 2009). Entretanto, a razão para esse fato ainda permanece obscura por causa dos poucos estudos desenvolvidos nesses ambientes.

Alterações nas características do solo frente à variação altitudinal já foram observadas na porção da Mata Atlântica situada na Serra do Mar, com uma maior disponibilidade de P, matéria orgânica e teor de Al encontrados em áreas de florestas nas regiões mais altas em

comparação com as menores altitudes (MARTINS, 2010). Sabe-se que esses atributos do solo exercem grande influência na distribuição dos FMA (ENTRY et al., 2003; OEHL et al., 2010; BAINARD et al., 2014). Em geral, elevada disponibilidade de nutrientes no solo e baixos valores de pH apresentam uma correlação negativa com os FMA (ENTRY, 2002; LEKBERG et al., 2007; GRILLI et al., 2013). Entretanto, ainda muito pouco se conhece sobre a influência dos parâmetros do solo na comunidade dos DSE, apenas sabe-se que condições estressantes do solo, como elevada acidez e presença de metais pesados podem favorecer esses endófitos (POSTMA et al., 2007; BAN et al., 2012).

Em levantamentos realizados a campo, em floresta mista, outro ponto que deve ser considerado é a planta hospedeira, pois esta responde de maneira diferenciada à interação com os micro-organismos associados e ainda muito pouco se sabe sobre o papel da espécie de planta na estruturação da composição da comunidade dos FMA e DSE. Embora tenha sido considerado que os parceiros da simbiose planta-FMA apresentam baixa especificidade, particularmente por causa do pequeno número de espécies de FMA em relação ao grande número de espécies de plantas envolvido na simbiose (SMITH; READ, 2008), alguns autores indicam que a identidade da planta hospedeira pode modular a comunidade de FMA presente em determinado ambiente (ÖPIK et al., 2009). Características da planta hospedeira como, por exemplo, a identidade genética, anatomia da raiz, estágio fisiológico e grupos ecológicos a que pertencem, são responsáveis por diferenças na intensidade da colonização pelo FMA (GRILLI et al., 2013; VERESOGLOU; RILLIG et al., 2014; ZANGARO et al., 2014). No entanto, o que determina a preferência de certas espécies de FMA por certas espécies de plantas, ou virse - versa ainda é desconhecido. Para os DSE, nada se sabe sobre a relação entre espécie vegetal e espécie do fungo endofítico.

Uma vez que os DSE e os FMA compartilham o mesmo habitat, as interações entre eles são inevitáveis. Li e Guan (2007) relataram uma íntima relação entre DSE e FMA, sugerindo que pode ocorrer uma cooperação ou talvez competição entre eles. Existe um único estudo desenvolvido visando elucidar esse tema (SARAVESI et al., 2014) e, neste ficou comprovado que a interação é muito mais complexa do que se imagina e que futuros estudos devem ser conduzidos afim de trazer mais esclarecimentos sobre esse assunto.

Diante de tudo que foi exposto o estudo da ocorrência e diversidade dos FMA e dos DSE e de fatores bióticos e abióticos associados, mostra-se bastante promissor e relevante. O estudo dos DSE é relevante também por seu caráter inovador, uma vez que não foram encontrados trabalhos sobre diversidade desse grupo de fungos publicados no Brasil.

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos de fatores ecológicos do ambiente (planta hospedeira, sazonalidade, altitude e características do solo) na ocorrência e diversidade dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e endofíticos dark septate (DSE) em Floresta Ombrófila Densa, na Mata Atlântica, localizada na região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil e verificar qual a contribuição dos DSE para o desenvolvimento vegetal. Também pretende-se explorar a ideia de uma eventual interação entre este grupo de fungos e os FMA. Tais objetivos fundamentam-se nas seguintes hipóteses: 1) Dentro do ambiente de gradiente altitudinal, as comunidades dos FMA e DSE são influenciadas pela variação de altitude; 2) A sazonalidade, a planta hospedeira e as características do solo selecionam espécies de FMA e DSE em cada altitude e 3) os DSE interagem com os FMA com efeitos no desenvolvimento das plantas.

Referências

- ADDY, H.D.; PIERCEY, M.M.; CURRAH, R.S. Microfungal endophytes in roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 83, p. 1-13, 2005.
- BAINARD, L.D.; BAINARD, J.D.; HAMEL, C.; GAN, Y. Spatial and temporal structuring of arbuscular mycorrhizal communities is differentially influenced by abiotic factors and host crop in a semi-arid prairie agroecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 88, p. 333-344, 2014.
- BAN, Y.; TANG, M.; CHEN, H.; XU, Z.; ZHANG, H.; YANG, Y. The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. **Plos One**, São Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012
- BŁASZKOWSKI, J. **Glomeromycota**. Kraków: W. Szafer Institute of Botany; Polish Academy of Sciences, 2012. 303 p.
- BONFIM, J.A.; VASCONCELLOS, R.L.F.; STURMER, S.L.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian Atlantic forest: A gradient of environmental restoration. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 71, p. 7-14, 2013.
- CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, I.M.; NOGUEIRA, M.A.; MALUCHE BARETTA, C.R.D.; DE PAULA, A.M. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. v. 1, p. 153-215.
- COLOMBO, A.F.; JOLY, C.A. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, p. 697-708, 2010.

DE SOUZA, F.A.; STUMER, S.L.; CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. v. 1, p. 15-75.

DETMANN, K.S.C.; DELGADO, M.N.; REBELLO, V.P.A.; LEITE, T.S.; AZEVEDO, A.A.; KASUYA, M.C.M.; ALMEIDA, A.M. Comparação de métodos para a observação de fungos micorrízicos arbusculares e endófitos do tipo Dark Septate em espécies nativas de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1883-1890, 2008.

DOSSIÊ MATA ATLÂNTICA. **Projeto de monitoramento participativo da Mata Atlântica**. São Paulo: Instituto Sócioambiental, 2001. 409 p.

ENTRY, J.A.; RYGIEWIEZ, P.T.; WATRUD, L.S.; DONNELLY, P.K. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. **Advances in Environmental Research**, Catalonia, v. 7, p. 123-138, 2002.

GÓMEZ, S. P. M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica**. 2012. 111 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GOTO, B.T. **Aspectos gerais da classificação**. 2014. Disponível em: <<http://glomeromycota.wix.com/lbmicorrizas#!c1/c229i>>. Acesso em: 17 dez. 2014.

GRÜNIG, C.R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T. N. Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. In: PIRTTILÄ, A.M.; FRANK, C. (Ed.). **Endophytes of forest trees: biology and applications**. Berlin: Springer, 2011. p. 3-30. (Springer Forestry Series, 80).

GRILLI, G.; URCELAY, C.; GALETTO, L. Linking mycorrhizal fungi and soil nutrients to vegetative and reproductive ruderal plant development in a fragmented forest at central Argentina. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 310, p. 442–449, 2013.

JOLY, C.A.; ASSIS, M.A.; BERNACCI, L.C.; TAMASHIRO, J.Y.; CAMPOS, M.C.R.; GOMES, J.A.M.A.; LACERDA, M.S.; SANTOS, F.A.M.; PEDRONI, F.; PEREIRA, L.S.; PADGURSCHI, M.C.G.; PRATA, E.M.B.; RAMOS, E.; TORRES, R.B.; ROCHELLE, A.; MARTINS, F.R.; ALVES, L.F.; VIEIRA, S.A.; MARTINELLI, L.A.; CAMARGO, P.B.; AIDAR, M.P.M.; EISENLOHR, P.V.; SIMÕES, E.; VILLANI, J.P.; BELINELLO, R. Florística e fitossociologia em parcelas permanentes da Mata Atlântica do sudeste do Brasil ao longo de um gradiente altitudinal. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 12, p. 1-23, 2012.

JUMPPONEN, A. Dark septate endophytes: are they mycorrhizal? **Mycorrhiza**, New York, v. 11, p. 207-211, 2001.

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

KNAPP, D.G.; PINTYE, A.; KOVÁCS, G.M. The dark side is not fastidious – dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. **Plos One**, São Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012.

KÖRNER, C. The use of “altitude” in ecological research. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 22, p. 569–574, 2007.

LEKBERG, Y.R.T.; KOIDE, R.; ROHR, J.R.; ALDRICH-WOLFE, L.; MORTON, J.B. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Journal of Ecology**, Malden, v. 95, p. 95-105, 2007.

LI, A.R.; GUAN, K.Y. Mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Pedicularis* species from Northwest of Yunnan Province, China. **Mycorrhiza**, New York, v. 17, p. 103-109, 2007.

LI, L.F.; YANG, A.; ZHAO, Z.W. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 54, p. 367–373, 2005.

LUGO, M.A.; NEGRITTO, M.A.; JOFRE, M.; ANTON, A.; GALETTO, L. Colonization of native Andean grasses by arbuscular mycorrhizal fungi in Puna: a matter of altitude, host photosynthetic pathway and host life cycles. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 81, p. 455–466, 2012.

MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. **Mycorrhiza**, New York, v. 18, p. 145-155, 2008.

MANDYAM, K.G.; JUMPPONEN, A. Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 1-13, 2015

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, p. 13-19, 2009.

MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, estado de São Paulo**. 2010. 155 p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MASSENSINI, A.M.; BONDUKI, V.H.A.; TÓTOLA, M.R.; FERREIRA, F.A.; COSTA, M.D. Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants. **Mycorrhiza**, New York, v. 24, p. 153–159, 2014.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 393-399, 2007.

NEWSHAM, K.K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 90, p. 783–793, 2011.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; PALENZUELA, J.; INEICHEN, K.; SILVA, G.A. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. **IMA Fungus**, London, v. 2, p. 191–199, 2011.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; MADER, P.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Zurich, v. 134, p. 257-268, 2009.

OEHL, F.; LACZKO, E.; BOGENRIEDER, A.; STAHR, K.; BÖSCH, R.; VAN DER HEIJDEN, M.; SIEVERDING, E. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 42, p. 724–738, 2010.

OLSSON, P.A.; THINGSTRUP, I.; JAKOBSEN, I.; BÅÅTH, E. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 31, p. 1879-1887, 1999.

ÖPIK, M.; METSIS, M.; DANIELL, T.J.; ZOBEL, M.; MOORA, M. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. **New Phytologist**, Cambridge, v. 184, p. 424-437, 2009.

ÖPIK, M.; ZOBEL, M.; CANTERO, J.J.; DAVISON, J.; FACELLI, J.M.; HIIESALU, J.; JAIRUS, T.; KALWIJ, J.M.; KOOREM, K.; LEAL, M.E.; LIIRA, J.; METSIS, M.; NESHATAEVA, V.; PAAL, J.; PHOSRI, C.; PÕLME, S.; REIER, Ü.; SAKS, Ü.; SCHIMANN, H.; THIÉRY, O.; VASAR, M.; MOORA, M. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, New York, v. 23, p. 411–430, 2013.

PEREIRA, G.M.D.; RIBEIRO, K.G.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; VITAL, M.J.S.; KASUYA, M.C.M.; ZILLI, J.É. Ocorrência de fungos endofíticos “dark septate” em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 331-334, 2011.

PETERSON, R.L.; WAGG, C.; PAUTLER, M. Associations between microfungi endophytes and roots: do structural features indicate function? **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 86, p. 445-456, 2008.

POSTMA, J.W.M.; OLSSON, P.A.; FALKENGREN-GRERUP, U. Root colonization by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 39, p. 400–408, 2007.

RANELLI, L.B.; HENDRICKS, W.Q.; LYNN, J.S.; KIVLIN, S.N.; RUDGERS, J.A. Biotic and abiotic predictors of fungal colonization in grasses of the Colorado Rockies, **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 1, p. 1–15, 2015.

REININGER, V.; SIEBER, T.N. Mycorrhiza reduces adverse effects of dark septate endophytes (DSE) on growth of conifers. **Plos One**, São Francisco, v. 7, p. 1-10, 2012.

- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Essex, v. 142, p. 1141-1153, 2009.
- RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, G.M.D.; MOSQUEIRA, C.A.; BARAÚNA, A.C.; VITAL, M.J.S.; SILVA, K.; ZILLI, J.É. Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos dark septate a partir de plantas de arroz. **Agro@mbiente**, Boa Vista, v. 5, p. 97-105, 2011.
- RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 28, p. 355-363, 2004.
- RODRIGUEZ, R.J.; WHITE, J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, p. 314–330, 2009.
- RUOTSALAINEN, A.L.; VARE, H.; OKSANEN, J.; TUOMI, J. Root fungus colonization along an altitudinal gradient in North Norway. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 36, p. 239-243, 2004.
- SANTOS, E.A.; FERREIRA, L.R.; COSTA, M.D.; SILVA, M.C.S.; REIS, M.R.; FRANÇA, A.C. Occurrence of symbiotic fungi and rhizospheric phosphate solubilization in weeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Madison, v. 35, p. 49-55, 2013.
- SARAVESI, K.; RUOTSALAINEN, A.L.; CAHILL, J.F. Contrasting impacts of defoliation on root colonization by arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Medicago sativa*. **Mycorrhiza**, New York, v. 24, p. 239–245, 2014.
- 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) *Gigaspora rosea*. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 41, p. 1753-1756, 2009.
- SCHMIDT, S.K.; SOBIENIAK-WISEMAN, L.C.; KAGEYAMA, S.A.; HALLOY, S.R.P.; SCHADT, C.W. Mycorrhizal and Dark-Septate fungi in plant roots above 4270 meters elevation in the Andes and Rocky Mountains. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 40, p. 576-583, 2008.
- SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1413-1421, 2001.
- SIEBER, T.N.; GRÜNIG, C.R. Biodiversity of fungal root endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* s.l. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T.N. (Ed.). **Microbial root endophytes**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 107–132. (Soil Biology, 9).
- SMITH, S.E., READ, D.J. The symbiontes forming arbuscular mycorrhizas. In: SMITH, S.E.; READ, D.J. (Ed.). **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 13-41.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Mycorrhizal fungi reduce nutrient loss from model grassland ecosystems. **Ecology**, London, v. 91, p. 1163-1171, 2010.

VERESOGLOU, S.D.; RILLIG, M.C. Do closely related plants host similar arbuscular mycorrhizal fungal communities? A meta-analysis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 377, p. 395-406, 2014.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J.; BECKER, K.; FISCHER, M.; HEIER, T.; HÜCKELHOVEN, R.; NEUMANN, C.; VON WETTSTEIN, D.; FRANKEN, P.; KOGEL, K.H. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 13386-13391, 2005.

WANG, B.; QIU, Y.L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, New York, v. 16, p. 299-363, 2006.

ZANGARO, W.; MOREIRA, M. Micorrizas arbusculares nos biomas Floresta Atlântica e Floresta de Araucária. In: SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. v. 1, p. 279-310.

ZANGARO, W.; ALVES, R.A.; SOUZA, P.B.; ROSTIROLA, L.V.; LESCANO, L.E.A.M.; RONDINA, A.B.L.; NOGUEIRA, M.A. Succession and environmental variation influence soil exploration potential by fine roots and mycorrhizal fungi in an Atlantic ecosystem in southern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 30, p. 237-248, 2014.

ZHAO, D.; TAO, L.; SHENA, M.; WANG, J.; ZHAO, Z. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: evidence from RNA-seq data. **Microbiological Research**, Jena, v. 170, p. 27-35, 2015.

ZUBEK, S.; BŁASZKOWSKI, J.; DELIMAT, A.; TURNAU, K. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte colonization along altitudinal gradients in the Tatra Mountains. **Arctic, Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 41, p. 272-279, 2009.

2 OCORRÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE EM ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA EM UM GRADIENTE DE ALTITUDE

Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são comuns em diversos ecossistemas e proporcionam às plantas uma série de benefícios, além de favorecer a estruturação dos solos. Plantas abrigam tanto os FMA como também fungos de micélio escuro (DSE do inglês, *dark septate endophytes*). Embora de estudo recente, já se observou que os endófitos de micélio escuro são tão abundantes quanto os FMA e igualmente podem promover o crescimento de plantas, em diversos ambientes. O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência dos FMA e DSE através da avaliação do número de esporos de FMA e da colonização radicular por FMA e DSE em sete espécies arbóreas (*Euterpe edulis* Mart., *Cecropia glaziovii* Snethl., *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, *Bathysa australis* (A.St.-Hil.) Benth. & Hook., *Mollinedia schottiana* (Spreng.) Perkins, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis* DC.) presentes na Mata Atlântica brasileira em um gradiente altitudinal (80m, 600m e 1000m), além de verificar a influência da planta hospedeira, dos atributos do solo, da sazonalidade e da altitude sobre a ocorrência desses fungos. Todas as espécies arbóreas estudadas apresentaram colonização por FMA e DSE. Observa-se um efeito altitudinal e da planta hospedeira sobre o número de esporos e colonização por DSE e FMA. A época de amostragem teve efeito apenas sobre a colonização pelos FMA. Os parâmetros químicos do solo tiveram fundamental influência sobre a colonização pelos FMA, enquanto que para os DSE as diferenças na colonização parecem ser pouco afetadas pelos parâmetros do solo.

Palavras-chave: Micorrizas; Esporos; Ascomycota; Floresta tropical

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) there are fundamental role in the absorption of nutrients, plant survival and soil structure. Currently, studies of the importance of AMF in ecosystems are increasing worldwide. Recently a number of researchers found that plants associated with AMF also may be associated with dark mycelium endophytes. In a recent report it was stated that the dark septate endophytes (DSE), usually Ascomycetes, do promote the growth of plants in different environments. The purpose of this study is to survey the presence of AMF and DSE in seven tree species *Euterpe edulis* Mart., *Cecropia glaziovii* Snethl., *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, *Bathysa australis* (A.St.-Hil.) Benth. & Hook., *Mollinedia schottiana* (Spreng.) Perkins, *Coussarea* sp. and *Myrcia spectabilis* DC. in Atlantic Forest areas in an altitudinal gradient (80m, 600m e 1000m), and to verify the influence of the host plant, soil attributes, seasonality and altitude on the occurrence of these fungi. All tree species showed colonization by AMF and DSE. We found an altitudinal and host plant effect on the AMF spore numbers and on AMF and DSE root colonization. Seasonality had an effect only on AMF colonization. Chemical soil attributes had a strong influence on AMF colonization, whereas for the DSE, differences in colonization do not seem to be related to soil attributes.

Keywords: Mycorrhizae; Spores; Ascomycota; Tropical forest

2.1 Introdução

A Mata Atlântica é um bioma de floresta tropical que ocupa 15% do território brasileiro. Ao todo são 1.315.460 Km² de florestas que estão distribuídas ao longo da costa leste do Brasil, indo do estado do Rio Grande do Sul até o Piauí. É um bioma extremamente rico, com um dos maiores níveis de endemismos do mundo (MYERS et al., 2000) e, no entanto, é considerado um dos mais ameaçados do planeta, restando apenas 16% da área original (RIBEIRO et al., 2009). A porção da mata atlântica situada ao longo do litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil, é uma área muito interessante para estudos ecológicos, uma vez que em curta distância tem-se uma grande variação altitudinal, além de abrigar espécies arbóreas nativas quase extintas (JOLY et al., 2012). Muitos estudos nessas áreas têm sido dedicados a comunidade de espécies de plantas e animais, no entanto a comunidade de micro-organismos tem recebido muito menos atenção.

Quase todas as plantas terrestres são hábeis em formar associações com os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e estes são fungos do filo Glomeromycota e proporcionam às plantas uma maior absorção de água e nutrientes, principalmente P e outros nutrientes poucos móveis no solo (SCHÜßLER et al., 2001; SMITH; READ, 2008). Os FMA também contribuem para uma melhor estruturação do solo, através da produção de uma glicoproteína denominada glomalina (RILLIG et al., 2004).

Além dos FMA, uma série de outros fungos também coloniza as raízes das plantas e recentemente muita atenção tem-se dado aos fungos endofíticos de micélio escuro (DSE, do inglês, *dark septate endophytes*). Estes fungos em sua maioria são Ascomycetos e são caracterizados por possuírem hifas septadas de coloração marrom e produzirem microescleródios nas raízes das plantas (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; GRÜNIG, 2011). Muitos DSE podem ser patogênicos ou saprofíticos, no entanto alguns estudos vêm evidenciando que os DSE podem aumentar o crescimento das plantas e a absorção de N e P pelas raízes (JUMPPONEN, 2001; BARROW; OSUNA, 2002; NEWSHAM, 2011) e dessa forma podem auxiliar na nutrição das plantas, assim como os FMA (SCERVINO et al., 2009; UMA et al., 2012).

O gradiente altitudinal formado na área de Mata Atlântica na Serra do Mar remete a mudanças importantes no ambiente, como as condições de precipitação, temperatura do ar, pressão atmosférica, radiação solar, entre outras (KÖRNER, 2007). A influência do gradiente altitudinal na colonização por fungos tem sido documentada em diferentes ecossistemas (RUOTSALAINEN et al., 2004; SCHMIDT et al., 2008). Em geral a colonização pelo FMA

diminui com o aumento da altitude (GAI et al., 2012), enquanto que a colonização pelos DSE pode aumentar com a elevação (SCHMIDT et al., 2008). Tais respostas de colonização podem estar associadas às características do solo que, como comprovado, é variável ao longo do gradiente de altitude (MARTINS, 2010). De fato, elevada disponibilidade de nutrientes no solo e baixos valores de pH interferem negativamente na micorrização com FMA (ENTRY, 2002; LEKBERG et al., 2007; GRILLI et al., 2013), enquanto que os DSE podem ser favorecidos em valores de pH mais baixos (POSTMA et al., 2007).

Além dos fatores edáficos, as condições de crescimento da planta também se modificam com a variação da altitude (JOLY et al., 2012), com mudanças fundamentais na ocorrência de fungos endofíticos, sejam FMA ou DSE. A identidade da planta hospedeira e a ocorrência de fungos co-infectantes podem adicionalmente influenciar a infecção fúngica (RANELLI et al., 2015). Embora existam evidências de especificidade hospedeira para fungos micorrízicos (GRILLI et al., 2013; VERESOGLOU; RILLIG et al., 2014; ZANGARO et al., 2014), poucos estudos avaliaram a variação no padrão de distribuição desses fungos simbiossiontes de uma planta para outra em um gradiente de altitude (RUOTSALAINEN et al., 2002; LI et al., 2005). Para os DSE pouca coisa se sabe sobre o efeito da identidade da planta hospedeira nos níveis de colonização.

Outro fator que deve ser considerado para um melhor conhecimento da ocorrência de um fungo simbiossionte em determinado local é a sazonalidade. Enquanto muitos estudos sugerem que a abundância máxima de colonização por FMA ocorre durante o verão e declina durante o inverno e início da primavera (DEMARS; BOERNER, 1995; LUGO et al., 2003; ESCUDERO; MENDOZA, 2005; MOREIRA-SOUZA et al., 2007; MANDYAM; JUMPPONEN, 2008; PEREIRA et al., 2010), outros não encontraram nenhum padrão sazonal (BRUNDRETT; ABBOTT, 1994; RUOTSALAINEN et al., 2002; GUADARRAMA et al., 2014). Já para os DSE muito pouco se sabe sobre a dinâmica desses fungos com relação às estações do ano, embora alguns relatos indiquem que eles também são sensíveis à sazonalidade (LI et al., 2005; MANDYAM; JUMPPONE, 2008).

Objetiva-se com esse trabalho conhecer a ocorrência de FMA e DSE em espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica brasileira, além de responder algumas questões sobre a influência da altitude, estação do ano, planta hospedeira e dos parâmetros do solo no grau de colonização por FMA e DSE e número de esporos de FMA.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

Área de estudo

A área de estudo está localizada no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, no Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), que representa a maior porção contínua preservada de Mata Atlântica do Brasil. Devido às suas dimensões, o PESM é administrado por Núcleos, que são bases instaladas em áreas de domínio do estado. Foram selecionadas para estudos três parcelas distribuídas em dois Núcleos: Núcleo Picinguaba (23°34'S e 45°02'W) que está situado no município de Ubatuba, com altitudes que atingem até 500 metros e o núcleo de Santa Virgínia (23°17'S e 45°11'W) em São Luiz do Paraitinga com altitudes que vão de 600 a 1.100 metros.

As áreas selecionadas para estudo fazem parte das parcelas permanentes do projeto Biota Gradiente Funcional, coordenado pelos pesquisadores Carlos Alfredo Joly (Unicamp) e Luiz Antônio Martinelli (Cena-USP). As áreas dentro do PESM foram previamente divididas num grid amostral e cada fitofisionomia (parcela) de 1 ha foi subdividida em 100 subparcelas de 10 x 10 metros. O método de amostragem e o protocolo utilizado para a seleção da área e demarcação das parcelas estão descritos detalhadamente em Joly et al. (2012).

Tabela 2.1 - Detalhamento das parcelas do projeto Biota Gradiente Funcional dentro do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, Brasil

Parcelas	Composição Florística	Altitude (m)
A	Mata de Restinga	10
B, C, D, E e F	Ombrófila Densa de Terras Baixas	33-120
G, H, I e J	Floresta Ombrófila Densa Submontana	176-395
O, P e Q	Floresta Ombrófila Densa Submontana	600-850
K, L, M e N	Floresta Ombrófila Densa Montana	1000-1100

Dentro do núcleo Picinguaba, que é o único que abrange a porção da orla marinha, a parcela escolhida para amostragem pertence a área de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas correspondente à parcela E (80 metros de altitude) do grid amostral, enquanto que no núcleo de Santa Virgínia foram coletadas amostras da parcela Q do grid amostral pertencente à Floresta Ombrófila Densa Submontana (altitude média de 600m) e da parcela K pertencente à Floresta Ombrófila Densa Montana (altitude de 1000m) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - A) Localização da área de estudo em amarelo; B) Distribuição das áreas de amostragem ao longo do gradiente – adaptado de Sanchez et al., (2013); C) Vista do interior das florestas onde foram realizadas as coletas de solo e raiz, ao longo do gradiente altitudinal da Floresta Ombrófila Densa das parcelas E (80m), Q (600m) e K (1000m), Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, Brasil

O relevo do PESM é dominado pela Planície Costeira e no sopé da encosta, no Núcleo Picinguaba, o clima é Tropical Úmido (Af) de acordo com o sistema de classificação Köppen (1948). Geralmente no Núcleo Picinguaba (parcela E), a média de precipitação anual é de 2624 mm, variando de 88 mm (Julho) a 376 mm (Janeiro) e a temperatura média é de 21,9°C, com temperaturas variando de 12,6°C (Julho) até 30,4°C (Fevereiro). Subindo a encosta, no Núcleo Santa Virgínia (parcelas Q e K), a média de precipitação mantém-se, mas a temperatura vai diminuindo à medida que a altitude aumenta e a temperatura média fica perto dos 12 °C (JOLY et al., 2012; SANCHEZ et al., 2013). Destaca-se ainda que quase diariamente a parte superior da encosta, geralmente acima de 400m, é coberta por uma densa neblina (JOLY et al., 2012). A precipitação média mensal e temperatura média mensal durante o período de amostragem encontram-se na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Precipitação média mensal (mm) e temperatura média do ar (°C) mensal, durante todo o período de amostragem, registradas nos Núcleo Picinguaba (parcela E) e Santa Virgínia (parcelas K e Q), Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, Brasil. Fonte INPE – Estações Picinguaba e Santa Virgínia. As setas indicam os meses nos quais foram realizadas as coletas

Segundo Martins et al. (2010), a distribuição dos solos na topossequência é bastante homogênea, predominando solos rasos, arenosos e bem drenados em toda a encosta. Os solos apresentam ao longo do perfil fragmentos de materiais primários grandes, duros e irregulares, são distróficos típicos, com alta diluição de nutrientes e alta saturação de alumínio e são classificados como Cambissolo háplico distrófico. O solo a 1000m de altitude é o mais

intemperizado e o mais antigo geologicamente (MARTINS, 2010). As características químicas e físicas dos solos de cada parcela encontram-se na tabela 2.2.

Coleta de solo e raízes

Foram selecionadas para amostragem raízes de sete espécies arbóreas sendo: *Euterpe edulis* Mart., *Cecropia glaziovii* Snethl., *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, *Bathysa australis* (A.St.-Hil.) Benth. & Hook., *Mollinedia schottiana* (Spreng.) Perkins, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis* DC. Estas espécies foram selecionadas por serem abundantes e comuns ao longo do gradiente altitudinal. Para ter certeza de que as raízes eram realmente da árvore escolhida, seguimos cada raiz do tronco até encontrar raízes mais finas para amostragem (Figura 2.3). Em cada parcela foram escolhidas cinco plantas de cada espécie arbórea para realizar a amostragem de solo e raiz, sendo que na rizosfera dessas plantas foram coletadas cinco amostras simples de solo na profundidade de 0-20 cm que, no final, constituíram uma amostra composta para análise dos atributos químicos, físicos e microbiológicos e, entre estes últimos, a ocorrência dos esporos de FMA. As coletas foram realizadas quatro vezes, sendo uma em cada estação do ano (julho/2012 – inverno; outubro/2012 – primavera; janeiro/2013 - verão e abril/2013-outono).

As raízes foram mantidas refrigeradas a 4°C até a chegada ao laboratório, sendo então lavadas e conservadas em solução de álcool 70% para posterior análise da colonização por FMA e DSE. O solo foi seco ao ar, peneirado e armazenado em câmara fria a 4°C para as análises posteriores.

Figura 2.3 - Detalhes da coleta da raiz de uma das espécies arbóreas selecionada para amostragem. Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil

Atributos químicos, físicos e microbiológicos dos solos

As análises químicas do solo foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Raij et al. (2001). O pH do solo foi determinado em H_2O através de um pHmetro. O Ca^{2+} , P e Mg^{2+} foram extraídos com uma resina de troca iônica. P foi quantificado colorimetricamente usando molibdato de amônio, enquanto que o Ca^{2+} e Mg^{2+} foram medidos por espectrofotometria de absorção atômica. O K^+ foi extraído do solo por Mehlich 1 (HCl 0,05 M + H_2SO_4) e quantificado por fotometria de chama. Al^{3+} foi extraído com KCl 1M e determinado por titulometria. $H+Al$ foi determinado por potenciometria em solução SMP a pH 7,0. A matéria orgânica foi determinada pela oxidação com $Na_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$ e H_2SO_4 (WALKLEY; BLACK, 1934). A análise de umidade foi realizada com amostras deformadas coletadas na profundidade de 0-20cm, secas em estufa a 105 °C e posterior pesagem. Dados referentes à porcentagem de areia, silte e argila foram fornecidos por Martins (2010).

O Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) foi estimado pelo método de fumigação-extração (VANCE et al., 1987). As amostras foram fumigadas com clorofórmio por 24 horas, seguidas de extração com K_2SO_4 (0,5 mol L^{-1}) e oxidação com $K_2Cr_2O_7$ (66mM) e posterior titulação com sulfato ferroso amoniacal em presença de difenilamina sulfonato de bário. A

atividade microbiana foi determinada através da respiração basal do solo (C-CO₂) em amostras de 100g de solo incubadas por 20 dias, a 28°C. Após esse período as amostras foram incubadas com NaOH (50 mmol L⁻¹) por 24 horas e o CO₂ liberado foi precipitado em solução de BaCl₂ (4 mol L⁻¹) e quantificado por titulação do NaOH com solução padronizada de HCl (50 mmol L⁻¹), usando fenolftaleína como indicador (ALEF; NANNIPIERI, 1995). As leituras foram realizadas durante um período de 15 dias. O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) que representa a taxa de liberação de C-CO₂ por unidade de C de biomassa microbiana, foi calculado a partir dos resultados de atividade respiratória basal e do CBM.

Extração de esporos de FMA

Os esporos foram extraídos de uma amostra de 50g de solo segundo metodologia descrita por Gerdemann e Nicolson (1963), passados por peneiras de 0,71 e 0,045 mm, e, em sequência, centrifugados em solução aquosa de sacarose 70%, a 2000 rpm, por dois minutos; esta etapa foi repetida 2 vezes. Após extração, os esporos foram conservados em freezer (-20°C) até o momento da contagem. Os esporos foram contados sob microscópio estereoscópico com aumento de 40x.

Avaliação da colonização radicular por FMA e DSE

As raízes foram retiradas da solução conservante e lavadas com água desmineralizada e, em seguida, clarificadas com solução de hidróxido de potássio 10% (KOH 10% v/v) e solução de peróxido de oxigênio 10% (H₂O₂ 10% v/v) (GIOVANNETTI; MOSSE 1980; MANDYAM; JUMPPONEN, 2008). Para observação da colonização micorrízica dos FMA e DSE, as raízes clarificadas foram imersas em solução corante contendo tinta de caneta azul e ácido acético (VIERHEILIG et al., 1998). Após a coloração, as raízes foram deixadas em lactoglicerol (ácido láctico, glicerol e água na proporção 1:1:1) por 12 horas. Os fragmentos de raízes foram dispostos em lâminas de microscopia, sendo cinco lâminas para cada amostra de raiz. Cada lâmina continha dez segmentos de raízes de aproximadamente 1cm cada. Foram atribuídas notas de 0 a 100 % para cada segmento, conforme a intensidade de colonização radicular observada. A presença de FMA foi verificada através da coloração azul das estruturas fúngicas, enquanto que, para os DSE, foi verificada a presença de hifas septadas e microescleródios de coloração marrom.

Análise estatística

Para análise estatística os dados de porcentagem de colonização radicular foram transformados para arco seno $(x/100)^{0,5}$ e os dados de número de esporos foram transformados para log $(X+1)$. Foi aplicada a ANOVA multifatorial para número de esporos, colonização radicular por FMA e DSE, considerando como fatores de variação a altitude, estação do ano e planta hospedeira. Para fatores com efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste LSD ($p < 0,05$) com auxílio do programa SAS (SAS INSTITUTE, 2008). Este teste de médias também foi aplicado para as demais variáveis. Também foi realizada a correlação de Pearson para verificar a influência dos atributos do solo nos padrões de colonização pelo FMA e DSE e número de esporos de FMA.

2.2.2 Resultados

Características químicas, físicas e microbiológicas das áreas estudadas

De modo geral todos os solos das parcelas apresentaram pH baixo, com elevada saturação por Al^{3+} e matéria orgânica e baixos níveis de nutrientes minerais (Tabela 2.2). A maior altitude (1000m), apresentou menor valor de pH, maior CTC, maior quantidade de matéria orgânica e Al^{3+} , enquanto que maiores valores de P disponível foram verificados na altitude intermediária (600m). Com relação à umidade, o solo da floresta localizada na altitude de 600m apresentou maior conteúdo de água no solo em comparação com os demais. A textura do solo diferiu entre as altitudes, sendo que o solo da floresta localizada na menor altitude (80m) foi o mais argiloso, enquanto que nos 600m foi encontrada uma maior quantidade de areia.

Tabela 2.2 - Caracterização química e física dos solos ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, nas altitudes: E (80m), Q (600m) e K (1000m), Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil

Características químicas	E(80m)	Q(600m)	K(1000m)
pH H ₂ O	4,6±0,21a	4,6±0,05a	4,1±0,13b
P disponível (mg dm ⁻¹)	3,9 ±1,0b	12,4±4,12a	4,8±1,6b
K ⁺ (mmol _c kg ⁻¹)	1,7±0,36b	2,5±0,34a	2,0±0,4b
Ca ²⁺ (mmol _c kg ⁻¹)	1,9±0,03b	4,1±1,6a	2,9±2,0ba
Mg ²⁺ (mmol _c kg ⁻¹)	1,9±0,5a	2,8±2,07a	3,1±2,1a
Al ³⁺ (mmol _c kg ⁻¹)	19,4±2,3c	26,9±4,6b	36,9±5,16a
H+Al (mmol _c kg ⁻¹)	90,6 ±7,5b	103,2±11,4b	191±42,5a
MO (g dm ⁻³)	42,1±14,5a	48,1±8,0b	108±27,9a
CTC (mmol _c kg ⁻¹)	96,2±8,3b	112,8±11,6b	200,7±46,3a
SB (%)	5,6±1,03b	9,4±2,8a	9,7±4,7ba
V (%)	5,14±0,9b	8,28±2,5a	4,32±1,3b
m (%)	77 ±3,3ba	74 ±6,9b	79±6,7a
Características físicas	E(80m)	Q(600m)	K(1000m)
Umidade do solo	28,9±15,0c	47,2±5,6a	36,3±5,08b
Areia (%)	56,6±9,4b	62,1±3,4a	53,9±14,4b
Silte (%)	8,4±2,6b	19,3±7,2a	23,8±9,6a
Argila (%)	35,1±8,6a	16,6±9,5c	22,3±10,8b

Médias seguidas por letras iguais dentro da mesma linha não diferem significativamente (LSD; $p < 0,05$). SB – soma de bases trocáveis (Ca, Mg, K). CTC – capacidade de troca catiônica total (SB+(H+Al)). m (%) - Saturação por Al. V (%) - Saturação por bases e MO - matéria orgânica do solo.

O C da biomassa microbiana foi em geral alto nas áreas estudadas (Tabela 2.3). Maiores valores de C da biomassa microbiana foram encontrados na altitude de 1000m, exceto para o outono, em que não foram verificadas diferenças entre K (1000m) e Q(600m). Maior atividade microbiana na maior altitude (1000m) pode ser confirmada pela respiração basal do solo, pois nesta altitude foram encontrados maiores valores de C-CO₂ em comparação com as demais. Observa-se também um aumento dos valores de C-CO₂ e biomassa microbiana depois do inverno e uma redução depois do verão para todas as áreas amostradas. Para o qCO₂, ocorreram diferenças apenas entre a altitude mais elevada (1000m) e a menor altitude (80m) no verão.

Tabela 2.3 - Respiração Basal (C-CO₂), Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) e quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) do solo nas altitudes: E(80m), Q(600m) e K(1000m), ecossistema de Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil

Variáveis	E(80m)	Q(600m)	K(1000m)
	julho/2012 (inverno)		
C-CO ₂ (µg CO ₂ g de solo dia ⁻¹)	22,2 bC*	33,6 bC	72,2 aB
CBM (µg C g solo ⁻¹)	168,8 cC	324,2 bB	471,6 aB
$q\text{CO}_2$ (µg CO ₂ µg CBM ⁻¹ dia ⁻¹)	0,34 aA	0,18 aA	0,22 aA
	outubro/2012 (primavera)		
C-CO ₂ (µg CO ₂ g de solo dia ⁻¹)	69,8 bA	111,5 abA	216,3 aA
CBM (µg C g solo ⁻¹)	611,1 cA	993,5 bA	1308,1 aA
$q\text{CO}_2$ (µg CO ₂ µg CBM ⁻¹ dia ⁻¹)	0,12 aB	0,10 aBA	0,15 aBA
	janeiro/2013 (verão)		
C-CO ₂ (µg CO ₂ g de solo dia ⁻¹)	53,4 bB	86,1 bB	182,4 aA
CBM (µg C g solo ⁻¹)	721,1 bA	916,6 bA	1448,1 aA
$q\text{CO}_2$ (µg C-CO ₂ µg CBM ⁻¹ dia ⁻¹)	0,08 bB	0,10 abBA	0,12 aBA
	abril/2013 (outono)		
C-CO ₂ (µg CO ₂ g de solo dia ⁻¹)	10,7 bC	14,6 bC	26,6 aB
CBM (µg C g solo ⁻¹)	430,0 bB	970,0 aA	1150,0 aA
$q\text{CO}_2$ (µg C-CO ₂ µg CBM ⁻¹ dia ⁻¹)	0,03 aB	0,01aB	0,02 aB

*Letras minúsculas na linha comparam as altitudes e letras maiúsculas na coluna comparam as estações pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Número de esporos e colonização radicular por FMA e DSE

O número médio de esporos encontrado nas quatro altitudes estudadas foi baixo, assumindo valor menor que 12 esporos em 50 gramas de solo seco (Tabela 2.4). Um maior número de esporos foi encontrado na área com maior altitude para todas as estações amostradas.

Tabela 2.4 - Número médio de esporos presente em 50g solo coletado nas altitudes: E (80m), Q(600m) e K(1000m), nas quatro estações estudadas, ecossistema de Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil

Altitude	julho/2012 (inverno)	outubro/2012 (primavera)	janeiro/2013 (verão)	abril/2013 (outono)
E(80m)	5,4 b*	8,0 b	6,9 ab	5,8 b
Q(600m)	7,0 b	5,4 b	5,0 b	5,4 b
K(1000m)	11,0 a	11,6 a	8,8 a	9,9 a

*Letras minúsculas nas colunas comparam as altitudes pelo teste LSD ($p < 0,05$).

No geral, todas as sete espécies arbóreas avaliadas foram colonizadas por FMA e DSE. Somente em alguns casos específicos foi verificada apenas colonização pelo FMA,

como ocorreu com *Guapira opposita* que foi colonizada apenas pelo fungo micorrízico na altitude intermediária (600m), em todas as estações. A porcentagem de colonização pelo FMA variou de 4% em *Guapira opposita* (altitude de 600m, na primavera) até 44% em *Myrcia spectabilis* (altitude de 1000m, primavera) (Tabela 2.5). A colonização pelo DSE foi considerada baixa, com valores menores que 14% e em muitos casos houve ausência de colonização (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 - Colonização radicular por FMA e DSE nas plantas hospedeiras presentes nas altitudes: E (80m), Q(600m) e K(1000m), nas quatro estações. Ecossistema de Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil

Planta hospedeira	FMA (%)			DSE (%)		
	Jul/2012 (inverno)					
	E	Q	K	E	Q	K
<i>Euterpe edulis</i>	35aA*	13bA	16baA	7bA	0cA	11aA
<i>Cecropia glaziovii</i>	26bB	33baA	37aA	1aA	3aA	0aA
<i>Guapira opposita</i>	7bA	12baAB	25aA	0bA	0bA	8aA
<i>Bathysa australis</i>	28aA	23aAB	17aA	4bA	0bA	13aA
<i>Mollinedia schottiana</i>	16aA	10aB	8aA	2bA	8aA	0cA
<i>Coussarea</i> sp.	19aA	8bA	-	3aA	0aA	-
<i>Myrcia spectabilis</i>	17aA	12bA	9bB	4aA	0bA	0b
Out/2012 (primavera)						
<i>Euterpe edulis</i>	12aB	9aA	13aA	1bB	2bA	8aA
<i>Cecropia glaziovii</i>	6bC	8bB	26aA	1aA	2aA	1aA
<i>Guapira opposita</i>	15aA	4aB	26aA	0bA	0bA	3aA
<i>Bathysa australis</i>	11aB	12aAB	25aA	3bA	1bA	8aB
<i>Mollinedia schottiana</i>	11aA	8aB	10aA	1bA	1aA	2aA
<i>Coussarea</i> sp.	24aA	24aA	9b	5aA	0aA	1a
<i>Myrcia spectabilis</i>	23bA	19bA	44aA	1aB	1aA	2aAB
Jan/2013 (verão)						
<i>Euterpe edulis</i>	34aA	30aA	31aA	3bB	3bA	10aA
<i>Cecropia glaziovii</i>	21bB	32abA	40aA	2aA	3aA	2aA
<i>Guapira opposita</i>	12aA	33aA	30aA	0bA	0bA	6aA
<i>Bathysa australis</i>	8aB	6aB	10aA	0bA	3bA	9aB
<i>Mollinedia schottiana</i>	17aA	8aB	23aA	1aA	0aA	5aB
<i>Coussarea</i> sp.	28aA	14bA	10b	4aA	2aA	3a
<i>Myrcia spectabilis</i>	14aA	13aA	8aB	6aA	0bA	0bB
Abr/2013 (outono)						
<i>Euterpe edulis</i>	14aB	12aA	27aA	1bB	3bA	10aA
<i>Cecropia glaziovii</i>	40aA	36aA	34aA	4aA	4aA	1aA
<i>Guapira opposita</i>	14aA	19aAB	35aA	6aA	0aA	9aA
<i>Bathysa australis</i>	34aA	31aA	19aA	2aA	0aA	1aB
<i>Mollinedia schottiana</i>	22aA	33aA	20aA	0aA	3aA	1aA
<i>Coussarea</i> sp.	29aA	15aA	-	3aA	3aA	-
<i>Myrcia spectabilis</i>	34aA	17aA	18aB	1bB	1bA	10aA

*Letras minúsculas nas linhas comparam as altitudes e letras maiúsculas nas colunas comparam as estações para um mesmo endófito e a mesma planta hospedeira pelo teste LSD ($p < 0,05$). (-) amostras de raízes insuficientes para avaliação.

Efeito da altitude, sazonalidade, planta hospedeira sobre o número de esporos de FMA e colonização radicular por FMA e DSE

Os resultados da ANOVA multifatorial considerando o efeito da altitude, planta hospedeira e estação do ano sobre o número de esporos, colonização radicular por FMA e DSE estão apresentados na tabela 2.6. A altitude e a planta hospedeira tiveram efeito sobre todos os parâmetros avaliados, porém a estação do ano influenciou somente a colonização por FMA. A interação entre estação do ano e planta hospedeira foi significativa para colonização pelos dois fungos, enquanto que a interação estação e altitude foi significativa apenas para colonização radicular por FMA. Também pode ser observado efeito da interação estação x altitude x planta hospedeira quando se avaliou a ocorrência dos FMA e DSE.

Tabela 2.6 - Resultados da ANOVA multifatorial para o número de esporos, colonização radicular por FMA e DSE

Efeito das variáveis	Número de Esporos		Colonização por FMA		Colonização por DSE	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Altitude	5,36	<0,0001	9,84	<0,0001	5,05	<0,0001
Planta hospedeira	25,44	<0,0001	6,22	0,0022	23,05	<0,0001
Altitude x planta hospedeira	2,02	0,0221	7,05	<0,0001	5,16	<0,0001
Estação do ano	1,62	0,1854	13,50	<0,0001	1,32	0,2676
Estação x planta hospedeira	1,20	0,2624	8,31	<0,0001	3,64	<0,0001
Estação x altitude	1,20	0,3049	5,27	<0,0001	1,61	0,1441
Estação x altitude x planta hospedeira	1,73	0,0081	1,89	0,0024	6,59	<0,0001

A altitude foi o fator que mais afetou a ocorrência dos fungos em questão. Observa-se que a floresta localizada na maior altitude (1000m) apresentou um maior número de esporos de FMA e também uma maior colonização radicular por FMA e DSE (Figura 2.4).

Figura 2.4 - A) número de esporos de FMA em 50g solo seco; B) colonização radicular por FMA e C) colonização por DSE encontrados nas altitudes: E (80m), Q(600m) e K(1000m), ecossistema de Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil. As letras indicam diferenças significativas entre as altitudes (teste LSD; $p < 0,05$)

A sazonalidade afetou apenas a colonização por FMA, com uma maior porcentagem de colonização no verão e outono (Figura 2.5). O número de esporos de FMA variou de 4 a 11 esporos 50g solo seco⁻¹ e foi muito semelhante em todas as áreas. Os valores de colonização radicular por FMA variaram de 9-32% no inverno, de 10-28% na primavera, de 14-33% no verão e de 16-37% no outono. Entretanto, a colonização radicular por DSE foi mais baixa, com valores variando de 1-13% no inverno, 2-6% na primavera, 3-6% no verão e de 2-6% no outono.

Figura 2.5 - Colonização radicular por FMA nas altitudes em estudo durante todo período de amostragem: Julho/2012(inverno), Outubro/2012(primavera), Janeiro/2013(verão) e Abril/2013(outono). As letras indicam diferenças significativas entre as estações do ano (teste LSD; $p < 0,05$)

A planta hospedeira foi um importante fator que atuou na ocorrência dos fungos nas altitudes avaliadas (Tabela 2.7). A espécie *Cecropia glaziovii* foi a que apresentou maiores níveis de colonização por FMA em comparação com as demais espécies, entretanto para os DSE, uma maior colonização foi encontrada em *Bathysa australis*, *Myrcia spectabilis* e *Euterpe edulis*. Um menor número de esporos foi recuperado no solo rizosférico de *Coussarea* sp. e *Guapira opposita*.

Tabela 2.7 - Colonização radicular por FMA e DSE nas raízes das plantas hospedeiras e número de esporos recuperados no solo rizosférico de cada uma das plantas hospedeiras. Ecossistema de Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil. Os valores referem-se as médias de cada parâmetro, considerando todas as estações e altitudes

Planta hospedeira	Colonização radicular por FMA (%)	Colonização radicular por DSE (%)	Número de esporos de FMA 50g solo seco ⁻¹
<i>Cecropia glaziovii</i>	28,4 a*	2,4 b	8,8 a
<i>Bathysa australis</i>	20,8 b	5,7 a	7,2 a
<i>Coussarea</i> sp.	17,0 b	3,1 b	4,2 b
<i>Myrcia spectabilis</i>	19,3 b	4,4 a	9,7 a
<i>Euterpe edulis</i>	20,8 b	4,5 a	8,6 a
<i>Mollinedia schottiana</i>	18,5 b	3,2 b	8,0 a
<i>Guapira opposita</i>	20,4 b	3,3 b	5,8 b

*Letras diferem as plantas hospedeiras pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Quando analisada a colonização das espécies arbóreas nas diferentes altitudes, observa-se que diferenças de colonização pelo FMA foram encontradas entre as altitudes para as espécies *Cecropia glaziovii*, *Coussarea* sp. e *Guapira opposita* (Figura 2.6). Para *Cecropia*

glaziovii e *Guapira opposita* uma maior porcentagem de colonização foi encontrada na maior altitude, enquanto que para *Coussarea* sp. uma maior porcentagem de colonização foi observada na menor altitude. Para os DSE, também foi possível observar diferenças entre as altitudes para algumas plantas hospedeiras; as espécies *Bathysa australis*, *Myrcia spectabilis*, *Euterpe edulis* e *Guapira opposita* apresentaram uma maior colonização na maior altitude (1000m).

Figura 2.6 - Colonização radicular por FMA e DSE nas plantas hospedeiras: *Cecropia glaziovii*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis*, nas altitudes em estudo. As letras indicam diferenças significativas entre as altitudes para uma mesma planta pelo teste LSD ($p < 0,05$)

Figura 2.7 - Raízes colonizadas pelo fungo micorrízico arbuscular (FMA) e endofítico dark septate (DSE). A e C: microescleródios em marrom, estrutura produzida pelo DSE; B: Hifas septadas dos DSE em marrom e em azul, hifas do FMA e D: raiz colonizada pelo FMA

Correlação entre os parâmetros do solo com o número de esporos e a colonização radicular por FMA e DSE

Dentre os parâmetros do solo avaliados, apenas oito (pH, P, K, Ca, Mg, SB, m% e matéria orgânica) tiveram relação com a ocorrência dos FMA e/ou DSE. Todos os atributos, exceto a MO, tiveram uma correlação negativa com a colonização por FMA. O número de esporos correlacionou-se negativamente com Ca, K e m% e positivamente com o pH. Entretanto, a colonização pelo DSE se correlacionou apenas com o pH do solo, sendo esta correlação negativa.

Tabela 2.8 - Coeficientes de correlação de Pearson para fatores químicos do solo e colonização radicular por FMA e DSE e número de esporos

	Colonização radicular por FMA	Colonização radicular por DSE	Número de esporos de FMA
DSE	0,09		
esporos	0,23*	0,08	
pH	0,37**	-0,19*	0,24*
P disponível	-0,37**	-0,08	-0,17
K ⁺	-0,63**	-0,08	-0,22*
Ca ²⁺	-0,80**	-0,06	-0,19*
Mg ²⁺	-0,65**	0,03	-0,14
SB%	-0,78**	-0,02	-0,18
m%	-0,91**	0,14	-0,21*
MO	0,21*	0,15	0,10

**indica coeficiente de correlação significativa, $p < 0,0001$ e *indica coeficiente de correlação significativa, $p < 0,001$.

2.2.3 Discussão

Os solos do estudo são considerados pobres em nutrientes, ácidos e com elevada saturação por Al^{3+} . A elevada acidez nos solos é comumente reportada em áreas de florestas, e está associada entre outros fatores a decomposição de detritos orgânicos e a respiração das raízes das plantas e micro-organismos (MARTINS et al., 2010). Dentre as altitudes estudadas, as mais elevadas (altitude de 1000 e 600m) podem ser consideradas as mais férteis por apresentarem maior saturação da CTC por bases, maiores quantidades de P disponível e matéria orgânica em comparação com a menor altitude (80m). Martins (2010) e Gómez (2012) também encontraram valores similares para as variáveis edáficas analisadas nessas mesmas áreas de estudo. Apesar dos baixos valores de V% e elevada acidez, o alto conteúdo de matéria orgânica ($>40\text{g dm}^{-3}$) contribui para a eficiente ciclagem biogeoquímica garantindo a exuberância biológica da floresta.

Os elevados valores de C da biomassa microbiana são característicos de áreas de florestas, onde geralmente o aporte de matéria orgânica é elevado e a atividade microbiana é intensa (MARIANI et al., 2006). Em três décadas de estudos de biomassa microbiana do solo em ecossistemas brasileiros foram encontrados valores de $683\text{-}1520\mu\text{g C g solo}^{-1}$ para a Floresta Atlântica (KASCHUK et al., 2010). Essa maior quantidade de micro-organismos pode contribuir para uma melhor ciclagem biogeoquímica de nutrientes, com maior disponibilidade destes para as plantas e melhor estruturação dos solos (MATSUOKA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2006). Os maiores valores de atividade microbiana e C da biomassa microbiana na área com maior altitude podem ser decorrentes da maior deposição de serrapilheira e maiores teores de C e N (MARTINS et al., 2011).

A esporulação e a taxa de colonização radicular pelo fungo micorrízico são consideradas baixas e possivelmente estão associadas aos parâmetros dos solos, principalmente a colonização micorrízica, que foi negativamente correlacionada com a maioria dos parâmetros químicos dos solos. Estudos prévios indicam que altas concentrações de Al^{3+} e baixos valores de pH podem inibir o crescimento da hifa e a germinação de esporos, diminuindo assim as suas possibilidades de colonizar as raízes das plantas, como observado no estudo em pauta (ENTRY et al., 2002; POSTMA et al., 2007; GÖRANSSON et al., 2008; CHRUMA et al., 2012). Entretanto, os DSE responderam de forma contrária ao FMA com relação ao pH, o que sugere que a colonização por esse endofítico é mais abundante em pH mais baixo, onde os teores de H^+ e Al^{3+} são mais altos, baseado na habilidade dos DSE em resistir melhor às condições ambientais extremas (POSTMA et al., 2007). Outro parâmetro do solo que esteve relacionado com a ocorrência dos FMA foi o teor de P no solo. A correlação negativa entre P e níveis de colonização têm sido reportada por diversos autores (OEHL et al., 2010; BAINARD et al., 2014), e indica uma resposta da planta a diminuição da dependência micorrízica devido a melhor condição nutricional (GRILLI et al., 2013).

O número de esporos encontrado em nosso estudo é considerado baixo, entretanto, está de acordo com o que normalmente é encontrado em áreas de floresta tropical brasileira, onde valores menores que 50 esporos em 50g solo são encontrados com frequência (TRUFEM, 1990; PEREIRA et al., 2011, BONFIM et al., 2011). Em florestas maduras o baixo número de esporos é considerado satisfatório, uma vez que nesse ecossistema as raízes estão emaranhadas e a colonização das raízes ocorre principalmente pelas interconexões de hifas no solo, e os esporos são considerados relativamente menos importantes do que outros propágulos infectivos (TRUFEM, 1990; ZANDEVALLI et al., 2008).

Baixos níveis de colonização encontrados também refletem o equilíbrio da floresta e é provável que sejam suficientes e adequados para as plantas se desenvolverem nesse ambiente. Geralmente em florestas de Mata Atlântica, onde as árvores são maduras e apresentam idade mais avançada, a colonização das raízes é geralmente baixa (AIDAR et al., 2004; STÜRMER et al., 2006; ZANGARO et al., 2014). Zangaro et al. (2014) também encontraram baixos valores de colonização radicular por FMA em raízes de árvores de florestas maduras (17% de colonização). Segundo os autores, árvores adultas são menos capazes de manter os fungos, devido à sua baixa atividade metabólica, menor investimento na produção de folhas e menor disponibilidade de luz, que pode resultar em menos carboidratos disponíveis nas raízes para os FMA. Campos (2009), em estudo realizado na mesma área (parcela E-80m de altitude), encontrou valores bem superiores (31,34% a 74,05% no inverno e de 11,43% a 80,00% no

verão) e não encontrou nenhuma diferença de colonização entre as estações. Estes maiores valores de colonização encontrados por Campos (2009) podem estar associados à avaliação de raízes provenientes de plantas mais jovens, onde já é reportado ter uma maior porcentagem de colonização (BONFIM, 2010; ZANGARO et al., 2014).

Com relação à porcentagem de colonização radicular por DSE, até o presente, poucos estudos avaliaram a colonização em árvores de florestas, onde normalmente os valores encontrados foram variáveis e dependentes da identidade da planta hospedeira. Já foram encontrados valores variando de < 1% em *Streblus asper* (Moraceae) a 65% em *Eucalyptus tereticornis* (Myrtaceae) por Uma et al. (2012), de 6 a 95% em coníferas (GRÜNIG et al., 2005) e de 5-20% em *Euphorbia acerensis* e *Euphorbia dentata* por Grilli et al. (2013). Entretanto, assim como os FMA, os DSE também são mais encontrados em plantas em estágio inicial de crescimento (SALOMÓN et al., 2013). Maior porcentagem de colonização radicular por FMA em comparação com os DSE pôde ser observada nas diferentes estações amostradas. Até o momento, poucos estudos têm comparado a colonização por FMA e DSE e normalmente ocorre uma maior colonização dos FMA em relação aos DSE (ZUBEK et al., 2009; UMA et al., 2012; LI et al., 2005).

O efeito sazonal foi observado apenas para colonização radicular por FMA. Uma maior colonização radicular por FMA foi encontrada no verão e no outono, onde termina o período chuvoso para início do período seco. Resultados semelhantes a estes também foram encontrados em outros estudos em áreas de Mata Atlântica brasileira (MOREIRA-SOUZA et al., 2007; PEREIRA et al., 2010) e em diversos habitats (DEMARS; BOERNER, 1995; LUGO et al., 2003; LI et al., 2005; ESCUDERO; MENDOZA, 2005; MANDYAM; JUMPPONEN, 2008). Fatores como a temperatura, fisiologia e metabolismo da planta tem sido relacionados ao efeito sazonal da colonização por FMA (LUGO et al., 2003). O aumento da colonização das raízes no período das chuvas, que coincide com a época de maior crescimento das plantas, possivelmente é uma estratégia da planta para explorar melhor a água do solo (RAMOS-ZAPATA et al., 2011). De fato, a colonização micorrízica é uma característica que a planta pode regular dependendo de suas necessidades e dos benefícios que elas podem receber (FRUZY et al., 2014). Além do fator água no solo, no verão ocorre uma maior incidência luminosa, e os níveis mais elevados de luz podem aumentar a eficiência da fotossíntese, o que pode contribuir para mais compostos de carbono disponíveis ao crescimento do FMA (KOIDE et al., 2004; LI et al., 2005).

Apesar de não ter sido observado efeito sazonal para o número de esporos, muitas vezes é reportado que o aumento na umidade do solo provocado pelas chuvas pode aumentar

os propágulos de FMA, como hifas e esporos (TRUFEM et al., 1994; PEREIRA et al., 2011; BIRHANE et al., 2012). Contudo, outros relatos indicam que a maior esporulação do fungo micorrízico ocorre muitas vezes durante os períodos de seca, época em que o crescimento vegetal é menos favorável, em que não há florescimento ou frutificação, assim o carbono da planta não é direcionado para produzir estruturas reprodutivas da planta, mas sim para o fungo (ZANGARO et al., 2013; GUADARRAMA et al., 2014). Os DSE também não foram afetados pela época de amostragem. Ainda existe pouco conhecimento sobre a influência da sazonalidade na ocorrência desse endofítico. Enquanto a mudança de estação pode não ter nenhum efeito sobre a colonização (RUOTSALAINEN et al., 2002; FUCHS; HASELWANDTER, 2004), esta pode ser mais abundante durante o verão (MANDYAM; JUMPPONEN, 2008) ou o efeito sazonal pode ser diferente para cada espécie de planta avaliada (LI et al., 2005).

Cada planta hospedeira apresentou níveis de colonização pelo FMA variável ao longo do ano. Pouca coisa pode-se inferir sobre a colonização micorrízica nas espécies estudadas, uma vez que este é o primeiro trabalho sobre a situação micorrízica nessas plantas. Na literatura apenas um relato com uma espécie (*Cecropia schreberiana*) do mesmo gênero de uma das plantas estudadas foi encontrado e neste a porcentagem de colonização foi similar ao nosso estudo (MYSTER et al., 2013). Características da planta hospedeiras, como por exemplo, estado fisiológico e grupo ecológico a que as plantas pertencem, podem determinar o grau de infecção pelo fungo micorrízico. A produção de frutos e a altura das plantas são características que apresentam correlação negativa com a colonização micorrízica (GRILLI et al., 2013). Por outro lado, plantas pioneiras são mais dependentes da simbiose e normalmente tendem a apresentar uma maior porcentagem de infecção por FMA do que espécies secundárias e tardias (ZANGARO et al., 2013). Tal fato ficou comprovado em nosso estudo, uma vez que a espécie pioneira *Cecropia glaziovii* foi a planta que apresentou uma maior porcentagem de colonização radicular pelo FMA.

A mudanças na ambiente, frente a variação altitudinal, foi suficiente para influenciar a ocorrência tanto do fungo micorrízico quanto do DSE. O declínio na temperatura com o aumento da altitude (0,6-1,0°C por cada 100m de elevação; RUOTSALAINEN et al., 2004), pode ter contribuído para uma maior colonização por FMA e DSE e também para um maior número de esporos na maior altitude (1000m). Melhores condições edáficas nessa altitude, possivelmente estão contribuindo para o melhor estabelecimento dos micro-organismos, além disso, na área com maior altitude ocorre uma elevada quantidade de bambus (*Merostachys*

neesii Rupr.), cerca de 580 moitas (PADGURSCHI, 2010), que é uma planta que abriga os dois fungos simbiotes (BONFIM et al., 2012).

Os resultados deste estudo contrariam o que normalmente tem sido proposto: diminuição na ocorrência ou até mesmo ausência dos FMA, enquanto que os DSE predominam nas maiores altitudes (RUOTSALAINEN et al., 2004; LUGO et al., 2012). As condições ambientais em cada altitude parecem dirigir a ocorrência dos FMA e DSE. Se o aumento da elevação está associada às condições mais inóspita do ambiente, de fato pode ocorrer uma maior colonização por DSE em detrimento do FMA, em virtude da capacidade dos fungos de micélio escuro em resistir melhor a condições extremas do ambiente (SCHMIDT et al., 2008). O importante reportado nesse estudo é que os DSE estavam presentes nas raízes das espécies de plantas colonizadas pelo FMA em todas as altitudes avaliadas. Assim mesmo em elevadas altitudes tanto os FMA quanto os DSE possuem a capacidade de se estabelecerem nas raízes das árvores e talvez possam ser determinantes para o desenvolvimento e estabelecimento das plantas naquele ambiente. A ocorrência dos DSE pode ser ecologicamente significativa, especialmente devido às evidências crescentes de que os DSE podem desempenhar funções semelhantes às do FMA, no aumento do crescimento da planta hospedeira, absorção de nutrientes e proteção contra patógenos radiculares (MANDYAM; JUMPPONEN, 2008).

Nosso estudo pode sugerir que os DSE possivelmente têm algumas funções ecológicas neste tipo de ecossistema que precisam ser mais bem investigadas. Se os DSE de fato fornecem algum benefício para suas plantas hospedeiras, torna-se extremamente importante saber se ou como eles complementam as funções dos FMA. Mais pesquisas para compreender a relevância desta simbiose em ecossistemas são necessárias.

Nesse estudo fez-se um grande esforço de amostragem (nas quatro estações do ano durante um ano inteiro) a fim de superar a grande imprecisão dos resultados que aparecem em estudos com apenas uma ou eventualmente duas épocas de amostragem no ano.

2.3 Conclusões

Pela primeira vez são apresentados os resultados de colonização radicular dupla, tanto por FMA como por DSE nas espécies arbóreas estudadas.

A ocorrência dos FMA foi afetada por todos os fatores analisados (altitude, sazonalidade, planta hospedeira e parâmetros do solo) enquanto que a dos DSE parece ser pouco influenciada pela mudança de estação e parâmetros do solo.

A ocorrência generalizada dos DSE encontrada reforça a necessidade de elucidar as funções destes fungos junto à planta e ao ambiente em que se encontram.

Referências

- AIDAR, M.P.M.; CARRENHO, R.; JOLY, C.A. Aspects of arbuscular mycorrhizal fungi in an Atlantic Forest chronosequence in Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), SP. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 4, p. 1-15, 2004.
- ALEF, K., NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. 576 p.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Application of Ecophysiological Quotients (qCO_2 and Q_d) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 251-255, 1990.
- BARROW, J.R.; OSUNA, P. Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. **Journal of Arid Environments**, Argentina, v. 51, p. 449-459, 2002.
- BAINARD, L.D.; BAINARD, J.D.; HAMEL, C.; GAN, Y. Spatial and temporal structuring of arbuscular mycorrhizal communities is differentially influenced by abiotic factors and host crop in a semi-arid prairie agroecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 88, p. 333-344, 2014.
- BIRHANE, E.; STERCK, F.J.; FETENE, M.; BONGERS, F.; KUYPER, T.W. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. **Oecologia**, v. 169, p. 895-904, 2012.
- BOHRER, K.E.; FRIESE, C.F.; AMON, J.P. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. **Mycorrhiza**, New York, v. 14, p. 329-337, 2004.
- BONFIM, J.A. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas restauradas de Mata Atlântica, São Paulo, Brasil**. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BONFIM, J.A.; VASCONCELLOS, R.L.F.; STURMER, S.L.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian Atlantic forest: a gradient of environmental restoration. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 71, p. 7-14, 2013.
- BONFIM, J.A.; PADGURSCHI, M.C.G.; MESCOLLOTTI, D.L.C.; JOLY, C.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Estudos preliminares sobre a ocorrência de Fungos Micorrízicos Arbusculares e Endofíticos “Dark Septate” em duas espécies nativas de bambu de Mata Atlântica em São Paulo, Brasil. In: FERTBIO 2012; REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 30.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 14.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 12.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 9.; I SIMPÓSIO SOBRE SELÊNIO NO BRASIL, 1., 2012, Maceió. **Anais...** Maceió, 2012. 1 CD-ROM.

BRUNDRETT, M.C.; ABBOTT, L.K. Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest. I. Seasonal study of inoculum levels. **New Phytologist**, Oxford, v. 127, p. 539–546, 1994.

CAMPOS, M.M.S. **Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, Ubatuba, SP**. 2009. 120 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

DEMARS, B.G.; BOERNER, R.E.J. Mycorrhizal dynamics of three woodland herbs of contrasting phenology along topographic gradients. **American Journal of Botany**, New York, v. 82, p. 1426–1431, 1995.

ENTRY, J.A.; RYGIEWIEZ, P.T.; WATRUD, L.S.; DONNELLY, P.K. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. **Advances in Environmental Research**, Massachusetts, v. 7, p. 123–138, 2002.

ESCUADERO, V.; MENDOZA, R. Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungi in temperate grasslands along a wide hydrologic gradient. **Mycorrhiza**, New York, v. 15, p. 291–299, 2005.

FUCHS, B.; HASELWANDTER, H. Red list plants: colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes, **Mycorrhiza**, New York, v. 14, p. 277–281, 2004.

GAI, J.P.; TIAN, H.; YANG, F.Y.; CHRISTIE, P.; LI, X.L.; KLIRONOMOS, J.N. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity along a Tibetan elevation gradient. **Pedobiologia**, Amsterdam, v. 55, p. 145–151, 2012.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 46, p. 235–244, 1963.

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

GÓMEZ, S.P.M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica**. 2012. 111 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GÖRANSSON, P.; OLSSON, P.A.; POSTMA, J.; FALKENGREN-GRERUP, U. Colonisation by arbuscular mycorrhizal and fine endophytic fungi in four woodland grasses—variation in relation to pH and Aluminium. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2260–2265, 2008.

GRILLI, G.; URCELAY, C.; GALETTO, L. Linking mycorrhizal fungi and soil nutrients to vegetative and reproductive ruderal plant development in a fragmented forest at central Argentina. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 310, p. 442–449, 2013.

GRÜNIG, C.R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T.N. Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. In: PIRTTILÄ, A. M., FRANK, C. (Ed.). **Endophytes of forest trees: biology and applications**. Berlin: Springer, 2011. p. 3-30. (Springer Forestry Series, 80).

GUADARRAMA P.; CASTILLO, S.; RAMOS-ZAPATA, J.A.; HERNÁNDEZ-CUEVAS, L.V.; CAMARGO-RICALDE, S.L. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: the effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest. **Pedobiologia**, Amsterdam, v. 57, p. 87–95, 2014.

JOLY, C.A.; ASSIS, M.A.; BERNACCI, L.C.; TAMASHIRO, J.Y.; CAMPOS, M.C.R.; GOMES, J.A.M.A.; LACERDA, M.S.; SANTOS, F.A.M.; PEDRONI, F.; PEREIRA, L.S.; PADGURSCHI, M.C.G.; PRATA, E.M.B.; RAMOS, E.; TORRES, R.B.; ROCHELLE, A.; MARTINS, F.R.; ALVES, L.F.; VIEIRA, S.A.; MARTINELLI, L.A.; CAMARGO, P.B.; AIDAR, M.P.M.; EISENLOHR, P.V.; SIMÕES, E.; VILLANI, J.P.; BELINELLO, R. Florística e fitossociologia em parcelas permanentes da Mata Atlântica do sudeste do Brasil ao longo de um gradiente altitudinal. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 12, p. 1-23, 2012.

JUMPPONEN, A. Dark septate endophytes: are they mycorrhizal? **Mycorrhiza**, New York, v. 11, p. 207-211, 2001.

_____. Soil fungal community assembly in a primary successional glacier forefront ecosystem as inferred from rDNA sequence analyses. **New Phytologist**, Oxford, v. 158, p. 569–578, 2003.

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

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1–13, 2010.

KOIDE, R.T.; MOSSE, B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. **Mycorrhiza**, New York, v. 14, p. 145–163, 2004.

KÖPPEN, W. **Climatologia**. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 479 p.

KÖRNER, C. The use of “altitude” in ecological research. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 22, p. 569–574, 2007.

LEKBERG, Y.R.T.; KOIDE, R.; ROHR, J.R.; ALDRICH-WOLFE, L.; MORTON, J.B. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Journal of Ecology**, Malden, v. 95, p. 95-105, 2007.

LI, L.F.; YANG, A.; ZHAO, Z.W. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 54, p. 367–373, 2005.

- LUGO, M.A.; GONZÁLEZ MAZA, M. E.; CABELLO, M.N. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from native Argentinian -South American- mountain grassland II. Seasonal variation of colonization and its relation with grazing and metabolic host type. **Mycologia**, Lexington, v. 95, p. 407–415, 2003.
- LUGO, M.A.; NEGRITTO, M.A.; JOFRE, M.; ANTON, A.; GALETTO, L. Colonization of native Andean grasses by arbuscular mycorrhizal fungi in Puna: a matter of altitude, host photosynthetic pathway and host life cycles. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 81, p. 455–466, 2012.
- MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. **Mycorrhiza**, New York, v. 18, p. 145-155, 2008.
- MARIANI, L.; CHANGA, S.X.; KABZEMS, R. Effects of tree harvesting, forest floor removal, and compaction on soil microbial biomass, microbial respiration, and N availability in a boreal aspen forest in British Columbia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1734-1744, 2006.
- MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, estado de São Paulo**. 2010. 155 p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- MATSUOKA, M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste, (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 425-433, 2003.
- MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 64, p. 393-399, 2007.
- MOREIRA-SOUZA, M.; TRUFEM, S.F.B.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, p. 211-215, 2003.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; da FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853–858, 2000.
- MYSTER, R.W.; LEBRON, L.; LOAYZA, A.B.P.; ZIMMERMAN, J.K. Mycotrophic strategy of 13 common neotropical trees and shrubs. **Journal of Tropical Forest Science**, Cambridge, v. 25, p. 34–41, 2013.
- NEWSHAM, K.K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 90, p. 783–793, 2011.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPOPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAN, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystem alteration among natural, reforested and agricultural land use in Southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 115, p. 237-247, 2006.

OEHL, F.; LACZKO, E.; BOGENRIEDER, A.; STAHR, K.; BÖSCH, R.; VAN DER HEIJDEN, M.; SIEVERDING, E. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 724–738, 2010.

PADGURSCHI, M.C.G. **Composição e estrutura arbórea de um trecho de Floresta Ombrófila Densa Montana com taquaras na Mata Atlântica**. 2010. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PEREIRA, J.M. **Atributos biológicos como indicadores de qualidade do solo em Floresta de Araucária nativa e reflorestada no Estado de São Paulo**. 2012. 138 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

POSTMA, J.W.M.; OLSSON, P.A.; FALKENGREN-GRERUP, U. Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 400-408, 2007.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.

RAMOS-ZAPATA, J.A.; GUADARRAMA, P.; NAVARRO-ALBERTO, J.; ORELLANA, R. Arbuscular mycorrhizal propagules in soils from a tropical forest and an abandoned corn field in Quintana Roo, Mexico: visual comparison of most-probable-number estimates. **Mycorrhiza**, New York, v. 21, p. 139–144, 2011.

RANELLI, L.B.; HENDRICKS, W.Q.; LYNN, J.S.; KIVLIN, S.N.; RUDGERS, J.A. Biotic and abiotic predictors of fungal colonization in grasses of the Colorado Rockies. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 1, p. 1–15, 2015.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**. Oxford, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 84, p. 355-363, 2004.

RUOTSALAINEN, A.L.; VARE, H.; OKSANEN, J.; TUOMI, J. Root fungus colonization along an altitudinal gradient in North Norway. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 36, p. 239-243, 2004.

- RUOTSALAINEN, A.L.; VÄRE, H.; VESTBERG, M. Seasonality of root fungal colonization in low-alpine herbs. **Mycorrhiza**, New York, v. 12, p. 29–36, 2002.
- SALOMÓN, S.M.E.; BARROETAVEÑA, C.; RAJCHENBERG, M. Occurrence of dark septate endophytes in nothofagus seedlings from Patagonia, Argentina. **Southern Forests**, Menlo Park, v. 75, p. 97–101, 2013.
- SANCHEZ, M. ; PEDRONI, F.; EISENLOHR, P.V.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Changes in tree community composition and structure of Atlantic rain forest on a slope of the Serra do Mar range, Southeastern Brazil, from near sea level to 1000 m of altitude. **Flora**, Freiberg, v. 208, p. 184–196, 2013.
- 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) *Gigaspora rosea*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1753–1756, 2009.
- SCHMIDT, S.K.; SOBIENIAK-WISEMAN, L.C.; KAGEYAMA, S.A.; HALLOY, S.R.P.; SCHADT, C.W. Mycorrhizal and Dark-Septate fungi in plant roots above 4270 meters elevation in the Andes and Rocky Mountains. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 40, p. 576–583, 2008.
- SMITH, S.E., READ, D.J. The symbiontes forming arbuscular mycorrhizas. In: SMITH, S.E.; READ, D.J. (Ed.). **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 13–41.
- STÜRMER, S.L.; KLAUBERG FILHO, O.; QUEIROZ, M.H.D.; MENDONÇA, M.M.D. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in soils of early stages of a secondary succession of Atlantic Forest in South Brazil. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 20, p. 513–521, 2006.
- TRUFEM, S.F.B. Aspectos ecológicos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares da Mata Tropical úmida da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 2, p. 31–45, 1990.
- TRUFEM, S.F.B.; MALATINSZKY, S.M.M.; OTOMOI, H.S. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosferas de plantas do litoral arenoso do parque estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 8, p. 219–229, 1994.
- UMA, E.; SATHIYADASH, K.; LOGANATHAN, J.; MUTHUKUMAR, T. Tree species as hosts for arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte fungi. **Journal of Forest Research**, Tokyo, v. 23, p. 641–649, 2012.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703–707, 1987.
- VERESOGLOU, S.D.; RILLIG, M.C. Do closely related plants host similar arbuscular mycorrhizal fungal communities? A meta-analysis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 377, p. 395–406, 2014.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHÈ, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 5004-5007, 1998.

WALKLEY, A.; BLACK, I.A. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. **Soil Science**, Philadelphia, v. 63, p. 251–263, 1934.

ZANDAVALLI, R.B.; STÜRMER, S.L.; DILLENBURG, L.R. Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi in forests with Araucaria in Southern Brazil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 35, p. 63-68, 2008.

ZANGARO, W.; ALVES, R.A.; SOUZA, P.B.; ROSTIROLA, L.V.; LESCANO, L.E.A. M.; RONDINA, A.B.L.; NOGUEIRA, M.A. Succession and environmental variation influence soil exploration potential by fine roots and mycorrhizal fungi in an Atlantic ecosystem in southern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 30, p. 237–248, 2014.

ZANGARO, W.; ROSTIROLA, L.V.; SOUZA, P.B.; ALVES, R.A.; LESCANO, L.E.A.M.; RONDINA, A.B.L.; NOGUEIRA, M.A.; CARRENHO, R. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. **Mycorrhiza**, New York, v.23, p. 221–233, 2013.

ZUBEK, S.; BLASZKOWSKI, J.; DELIMAT, A.; TURNAU, K. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte colonization along altitudinal gradients in the Tatra Mountains. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 41, p. 272–279, 2009.

3 DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO RIZOSFÉRICO E EM RAÍZES DE ÁRVORES DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA EM UM GRADIENTE ALTITUDINAL

Resumo

A diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi estudada em áreas de Mata Atlântica localizada na Parque Estadual da Serra do Mar, sudeste do Brasil, em raízes de sete plantas hospedeiras (*Euterpe edulis*, *Cecropia glaziovii*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis*) e nos respectivos solos rizosféricos. Estudou-se sua relação com parâmetros do solo, planta hospedeira, altitude e sazonalidade. As áreas de estudo estão localizadas em parcelas distribuídas ao longo de um gradiente de altitude: E(80m), Q(600m) e K(1000m). Amostras de solo (0-20 cm) foram coletadas em quatro estações do ano: do inverno de 2012 ao outono de 2013. Os esporos de FMA foram morfológicamente classificados e alguns parâmetros do solo foram determinados. A diversidade dos FMA nas raízes foi avaliada utilizando o par de primers NS31/AM1, com posterior clonagem e sequenciamento. Análises multivariadas, canônica discriminante (CDA) e de redundância (RDA) foram aplicadas nos dados. Foram identificadas no solo rizosférico 58 espécies de FMA e os gêneros *Acaulospora* e *Glomus* foram dominantes. No entanto, nas raízes, apenas 14 grupos de FMA foram encontrados e todos apresentaram elevada similaridade com a família Glomeraceae. A estrutura da comunidade dos FMA variou entre as altitudes e estações do ano e as espécies que mais contribuíram para esta variação foram: *Ambispora appendicula*, *Intraornatospora intraornata*, *Racocetra fulgida*, *Glomus* sp.4, *Cetraspora* sp.1, *Ambispora* sp.2, *Ambispora* sp.3, *Acaulospora* sp.2 aff. *Ac. lacunosa*, *Septoglomus titan* e *Paraglomus occultum*. Alguns parâmetros do solo (pH, matéria orgânica, atividade microbiana e carbono da biomassa microbiana) mostraram uma forte relação com a ocorrência de determinadas espécies. A maior diversidade de espécies de FMA, com base no índice de diversidade de Shannon, foi encontrada na maior altitude. A sazonalidade aparentemente não afetou a diversidade dos FMA. Nossos resultados mostram uma elevada diversidade de FMA, maior do que comumente encontrada em áreas de Mata Atlântica. Outro dado interessante, embora já previsto, é que a comunidade de FMA no interior das raízes da planta hospedeira foi diferente daquela do solo rizosférico e que as diferenças na estrutura da comunidade estão relacionadas à variação de altitude, mesmo em locais geograficamente próximos.

Palavras-chave: Esporos de FMA; Diversidade de espécies; Solos florestais; Glomeromicetos; Sazonalidade

Abstract

Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi was studied in the Atlantic rain forest in Serra do Mar Park (SE Brazil), in rhizospheric soils and in roots of seven host plants (*Euterpe edulis*, *Cecropia glaziovii*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea* sp. and *Myrcia spectabilis*) in relationship with their soil environment, altitude and seasonality. The studied plots are located along an elevation gradient located at 80, 600 and 1000m a.s.l. Soil samples (0-20cm) were collected in four seasons from SE Brazilian winter 2012 to autumn 2013. AMF spores were morphologically classified and chemical, physical and microbiological soil characteristics were determined. AMF diversity in roots was evaluated using the NS31/AM1 primer pair, and subsequent cloning and sequencing. Multivariate canonical discriminant analysis (CDA) and redundancy analysis (RDA) were applied to the data. In the rhizosphere 58 AMF species were identified. The genera *Acaulospora* and

Glomus were predominant. However, in the roots, only 14 AMF sequencing groups were found and all had high similarity to the family Gomeraceae. The AMF community structure varied between areas and seasons. The species that contributed the most to this variation were: *Ambispora appendicula*, *Intraornatospora intraornata*, *Racocetra fulgida*, *Glomus* sp.4, *Cetraspora* sp.1, *Ambispora* sp.2, *Ambispora* sp.3, *Acaulospora* sp.2 aff. *Ac. lacunosa*, *Septoglomus titan* and *Paraglomus occultum*. Some soil characteristics (pH, organic matter, microbial activity and microbial biomass carbon) showed a strong relationship with the occurrence of certain species. The highest AMF species diversity, based on Shannon's diversity index, was found for the highest altitude under study. Seasonality apparently did not affect diversity. Our results show a high AMF diversity, higher than commonly found in the Atlantic Forest. Another interesting finding is that the AMF community detected in roots or in the rhizosphere were different from each other and that differences in the community structure are related to variations in altitude even in geographically close lying sites.

Keywords: AMF spores; Species diversity; Forest soils; Glomeromycetes; Seasonality

3.1 Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA, filo Glomeromycota, SCHÜßLER et al., 2001) são os mais comuns microssimbiontes das raízes das plantas. Estes fungos colonizam as raízes de cerca de 80% das plantas, atuando como uma extensão do sistema radicular, permitindo uma maior absorção e utilização de nutrientes do solo (CARDOSO et al., 2010; SMITH; SMITH, 2012). Além de ajudar na maior aquisição e translocação de nutrientes, os FMA melhoram a capacidade das plantas em absorver água do solo, aumentam a resistência do sistema radicular contra estresses bióticos e abióticos (SMITH; READ, 2008) e contribuem para a formação de agregados nos solos (GIANINAZZI et al., 2010).

Geralmente em solos de florestas tropicais o pH é extremamente baixo e as quantidades de nutrientes disponíveis são limitantes (MARTINS et al., 2010). Devido às principais funções eco-fisiológicas fornecidas às plantas e aos solos, a presença dos FMA pode ser essencial à sobrevivência e ao estabelecimento das plantas que ali habitam (ZANGARO et al., 2014). De fato, uma comunidade diversificada de FMA é importante para o desenvolvimento e manutenção da diversidade de plantas (VAN DER HEIJDEN et al., 1998).

A Mata Atlântica, segunda maior floresta tropical do continente americano, abriga cerca de 20.000 espécies de plantas, sendo que destas, pelo menos a metade é encontrada apenas nesse bioma (MORELLATO; HADDAD, 2000; JOLY et al., 2012). Devido a essa grande biodiversidade e endemismo, a Mata Atlântica é considerada um dos 25 hotspots de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000), podendo apresentar uma grande diversidade de FMA e conter espécies desse fungo ainda não descritas pela ciência. No entanto, devido ao intenso desmatamento, a Mata Atlântica está entre as florestas tropicais mais ameaçadas do

mundo, com apenas cerca de 7% da área original preservados (SOS MATA ATLÂNTICA, 2014). Assim, estudos de diversidade dos FMA em biomas tão ameaçados como este tornam-se prioritários.

A diversidade dos Glomeromycetos é ainda surpreendentemente baixa quando comparada com a diversidade vegetal; talvez essa diversidade numérica seja parcialmente atribuível aos fatos de existirem muito mais estudos desenvolvidos com a comunidade de plantas e à baixa quantidade de caracteres morfológicos de distinção entre espécies de FMA. Por um longo tempo foi extremamente difícil distinguir espécies de FMA com morfologia de esporos semelhante, apesar de existir uma grande variação genética (DE SOUZA et al., 2010). Somente com o advento das análises moleculares estas imprecisões puderam ser superadas, sendo que apenas cerca de 270 espécies de FMA foram descritas até agora em todo o mundo (GOTO, 2014). Destas, 119 foram registradas no Brasil (DE SOUZA et al., 2010) e apenas 78 foram encontradas em áreas de Mata Atlântica (ZANGARO; MOREIRA, 2010).

Os estudos de taxonomia dos FMA vêm sendo constantemente desenvolvidos, novas espécies são regularmente descritas e os táxons reorganizados (OEHL et al., 2011; BLASZKOWSKI, 2012). As características morfológicas dos esporos tem sido a principal ferramenta para distinguir espécies e também para descrever espécies novas. Entretanto, para identificar a comunidade de FMA presente na raiz, análises moleculares são requeridas. Os FMA têm sido identificados nas plantas principalmente pela análise do RNAr, e a maioria das pesquisas usam a região do gene SSU RNAr (ÖPIK et al., 2013). Relatos indicam que os táxons de FMA presentes nas raízes representam a forma ativa da micorriza, enquanto que muitos esporos presentes no solo podem estar na forma dormente (SANDERS, 2004). Uma pesquisa de FMA no solo e colonizando as raízes pode resultar em comunidades completamente diferentes (HEMPEL et al., 2007; MIRÁS-AVALOS et al., 2011), refletindo a complexa dinâmica dos Glomeromycetos nos ambientes.

A diversidade dos FMA é afetada por diversos fatores bióticos e abióticos. A altitude tem sido um importante fator ambiental, pois está relacionada com uma série de outros fatores, como a temperatura, pressão atmosférica, pressão parcial de O₂ e CO₂ (KÖRNER et al., 2007), distribuição das espécies de plantas (JOLY et al., 2012) e características do solo (MARTINS et al., 2010). Essas mudanças no ambiente são importantes em determinar a diversidade de FMA. Evidências indicam que a composição da comunidade vegetal pode definir a composição dos FMA em ecossistemas tropicais (LOVELOCK et al., 2003; LOVELOCK; EWEL, 2005), uma vez que plantas com genótipos distintos podem apresentar uma comunidade micorrízica distinta (CAVAGNARO et al., 2001). Alguns parâmetros do

solo, tais como teores de carbono orgânico, nitrogênio, fósforo e pH são também frequentemente relatados como um importante fator na formação das comunidades dos FMA no campo (OEHL et al., 2010; BAINARD et al., 2014).

Já existe um grande número de trabalhos sobre a diversidade de FMA em áreas de Mata Atlântica (ANEXO A). A riqueza de FMA encontrada nesse bioma é elevada, com relatos de até 50 espécies de FMA (SANTOS; CARRENHO, 2011; PEREIRA et al., 2014) e geralmente ocorre uma predominância dos gêneros *Glomus* e *Acaulospora*. Entretanto, não encontramos nenhum estudo sobre a diversidade de FMA em áreas de Mata Atlântica em um gradiente altitudinal ou ainda nenhum levantamento mais detalhado considerando quatro estações do ano e a diversidade de FMA no solo e nas raízes das plantas hospedeiras.

O presente trabalho objetiva conhecer as espécies de FMA no solo rizosférico e em raízes de sete espécies arbóreas da Floresta Atlântica da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. Além de responder questões como: (1) A diversidade de FMA apresenta-se homogênea ao longo do gradiente altitudinal? (2) Quais espécies de FMA encontradas na rizosfera estão presentes nas raízes? (3) Como as diferentes espécies de FMA respondem às mudanças da altitude, sazonalidade e importantes parâmetros químicos, físicos e microbiológicos do solo?

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em dois núcleos administrativos do Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. O núcleo Picinguaba (23° 34'S e 45°02'W) está situado no município de Ubatuba e possui altitudes que atingem até 500 metros, enquanto que o núcleo de Santa Virgínia (23° 17'S e 45°11'W) está localizado em São Luiz do Paraitinga com altitudes que vão de 600 a 1.100 metros. Planícies costeiras raramente atingem mais de 1 km de distância da costa onde se encontram as encostas da serra, que são cada vez mais íngremes em direção às cristas e picos. Para este estudo, foram selecionadas um total de três sub-áreas de 10.000m² cada uma, chamadas: E (80m de altitude), Q (600m de altitude) e K (1000m de altitude) (JOLY et al., 2012). Maiores detalhes sobre a área de amostragem, tipo de solo, precipitação e temperatura média mensal de cada área de amostragem podem ser encontrados no item 2.2.1 e Figuras 2.1 e 2.2 do Capítulo 2.

Coleta de solo e raízes

Foram selecionadas para amostragem raízes de sete espécies arbóreas sendo: *Euterpe edulis* Mart., *Cecropia glaziovii* Snethl., *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, *Bathysa australis* (A.St.-Hil.) Benth. & Hook., *Mollinedia schottiana* (Spreng.) Perkins, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis* DC.. Estas espécies foram selecionadas por serem abundantes e comuns ao longo do gradiente altitudinal. Em cada parcela foram escolhidas cinco plantas de cada espécie arbórea para realizar a amostragem de raízes, certificando-se que os segmentos de raízes finas extraídas eram de fato ligados à árvore em questão. Na rizosfera de cada planta foram coletadas cinco amostras simples de solo na profundidade de 0-20 cm que, no final, constituíram uma amostra composta para análise dos atributos químicos, físicos e microbiológicos e, entre estes últimos, a diversidade de esporos de FMA. As coletas foram realizadas quatro vezes, sendo uma em cada estação do ano (julho/2012 – inverno; outubro/2012 – primavera; janeiro/2013 - verão e abril/2013-outono).

As raízes foram mantidas refrigeradas a 4°C até a chegada ao laboratório, sendo então lavadas e conservadas no freezer -80°C para posterior análise molecular. O solo foi seco ao ar, peneirado e armazenado em câmara fria a 4°C para as análises posteriores.

Dentre os parâmetros do solo, foram determinados o pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} , P disponível, K^+ , Al^{3+} , H+Al e Matéria Orgânica. Os parâmetros microbiológicos determinados foram: Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) e atividade microbiana, determinada através da respiração basal do solo (C-CO_2). O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) que representa a taxa de liberação de C-CO_2 por unidade de C na biomassa microbiana, foi calculado a partir dos resultados de atividade respiratória basal e do CBM. A metodologia empregada para avaliação dos parâmetros do solo encontra-se descrita no item 2.2.1 do Capítulo 2.

Extração de esporos e identificação morfológica dos FMA

Os esporos foram extraídos de uma amostra de 50 g de solo segundo metodologia já descrita no item 2.2.1 do Capítulo 2. Para a identificação taxonômica, os glomerosporos foram montados em lâminas semi-permanentes, com resina de álcool polivinílico e glicerol (PVLG) e reagente de PVLG + Melzer (1:1, v/v). Os esporos foram identificados com o auxílio de um microscópio óptico (100 a 400X) e pela consulta de bibliografia específica (SCHENCK; PEREZ, 1990; BLASZKOWSKI, 2012), descrições fornecidas pela Coleção Internacional de Fungos Micorrízicos Arbusculares e Vesiculares (invam <http://caf.wvu.edu>), descrições online da Coleção dos FMA do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Agricultura em Szczecin, na Polônia

(<http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/>) e através de publicações com as descrições das espécies novas.

Análise de diversidade de FMA

Após a identificação de todas as espécies de FMA foram determinados: (1) a riqueza de espécies (R), avaliada pela razão entre o número de espécies presentes em 50 g de solo e o número de amostras, (2) o índice de dominância de Simpson (Is) [$Is = 1/L$], onde: $L = \sum ni (ni - 1) / N (N - 1)$, ni = número de esporos de cada espécie de FMA "i", N = número total de espécies de fungos micorrízicos, e (3) o índice de diversidade de Shannon (H) [$H = - \sum (pi \log pi)$], onde: $pi = ni / N$; ni = número de cada espécie de FMA, N = número total de espécies.

As espécies foram classificadas como generalistas (presentes em todas altitudes e estações), intermediárias (presentes em até duas altitudes e três estações) e exclusivas (presentes em apenas uma altitude e estação do ano) (PEREIRA et al., 2014).

Análise molecular dos FMA

- Extração de DNA das raízes

Para o estudo da comunidade de FMA colonizando as raízes das plantas, nós selecionamos a estação que apresentou as maiores porcentagens de colonização radicular (outono-16-37%) (Ver capítulo 2). Um total de 105 amostras de raízes foram submetidas à extração de DNA. Antes de iniciar a extração de DNA, as raízes foram lavadas quatro vezes com água destilada para remoção de impurezas mais grosseiras, homogeneizadas e maceradas em nitrogênio líquido com o uso de almofariz e pilão de porcelana. Cada amostra continha 200 a 500 mg de raiz macerada, e estas foram transferidas para tubos de polietileno. Para extração de DNA das raízes foi utilizado o kit Power Soil DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CAUSA). O DNA foi extraído de acordo com o manual do fabricante.

As amostras de DNA das raízes foram submetidas à PCR, com o objetivo de determinar se o DNA era amplificável. Foi necessário utilizar a nested PCR para a amplificação do DNA alvo nas amostras. Na primeira PCR foram utilizados os iniciadores NS1 (5' GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') (WHITE, 1990), que são universais para Eukaryota. A primeira PCR foi realizada em solução contendo 0,1 µL da amostra de DNA, 0,1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador 100 pmol, 2,0 µL de dNTPs 10 mM, 3,75 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,35 de *Taq* DNA polimerase 5U e 1x o tampão de reação, e 14,7 µL de água estéril, totalizando um volume de 25 µL. Os fragmentos foram amplificados, após a desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 34 ciclos de 94°C por

30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos; e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Na segunda PCR, utilizaram-se os iniciadores: NS1(5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3'), universal para Eukaryota (SIMON et al., 1992) e AM1 (5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3'), específico para Glomeromycota (HELGASON et al., 1998), com as mesmas condições descritas acima. Para todos os ensaios, empregou-se uma reação controle negativa, sem DNA. Os amplicons obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) e visualizados após coloração com Gel red. Em seguida, as amostras foram purificadas utilizando PCR Clean-Up System Kit (Promega, San Luis Obispo, CA, USA) e quantificadas em gel por meio de comparação com marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) após eletroforese. Devido à baixa quantidade de DNA encontrada nas raízes, as repetições da mesma planta hospedeira em cada área foram colocadas juntas e concentradas num concentrador em vácuo -Speed Vac (Savant, Holbrook) por 2h, para que no final cada amostra atingisse uma quantidade de cerca de 20ng μL^{-1} de DNA.

- Clonagem e transformação de produtos de PCR

A clonagem dos amplicons foi realizada utilizando o Kit de clonagem “pGEM® - T Easy Vector Systems” (Promega). Utilizou-se o volume de 10 μ de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α . A transformação ocorreu por choque térmico, mantendo-se as amostras por 30min em gelo, 45 segundos em banho-maria a 42°C e voltando por dois minutos no gelo. Posteriormente, 250 μL de meio de SOC foram adicionados à mistura, que foi incubada a 37°C por 60 min, sob agitação constante de 250rpm. As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo LB (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) na concentração de 20g L^{-1} , solidificado com ágar 1,5% (LabCenter, Campinas São Paulo, Brasil), acrescido de ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos com concentração final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas. Os clones transformados foram selecionados a partir de colônias com coloração branca, as quais foram crescidas em 4ml de LB líquido com ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a 37°C por 12 horas, sob agitação constante de 250rpm.

Após a clonagem foram obtidos em média 20 clones positivos em cada placa. A presença dos insertos nos clones transformados foi confirmada por meio de PCR da colônia utilizando os iniciadores M13F e M13R do vetor. Obtivemos 234 clones positivos que foram encaminhados para o sequenciamento. O sequenciamento foi realizado diretamente a partir do produto de PCR utilizando os iniciadores AM1 e NS31, sendo a corrida realizada em

sequenciador 3730xl baseada no método de sequenciamento de Sanger (SANGER et al., 1977). As sequências de DNA foram editadas e comparadas com as bases de dados públicas utilizando BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Sequências que não correspondiam a Glomeromycota foram eliminadas do conjunto de dados, e as demais permaneceram para análises posteriores.

As sequências de FMA obtidas foram agrupadas em UTOs com semelhanças $\geq 97\%$ utilizando o programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009). Todas as sequências de Glomeromycota foram alinhadas utilizando ClustalW do programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). As relações filogenéticas entre as sequências fúngicas foram inferidas por meio da análise do neighbor joining (NJ) no programa MEGA 6.0. Os gaps sofreram deleção completa e o modelo de substituição usado foi o de Jukes-Cantor. A robustez da topologia inferida foi testada com 1000 replicatas de “bootstrap”. Para a construção da árvore filogenética, foram incluídas 23 sequências baixadas do GenBank. Como grupo externo foi usada a sequência de *Mortierella polycephala*, espécie de Zygomycota, que é um grupo próximo ao Glomeromycota (TEHLER et al., 2003; WANG; WANG, 2014)

Análise estatística

Os índices ecológicos de diversidade de FMA foram submetidos à análise de variância e em seguida as médias foram comparadas pelo teste LSD, $p < 0,05$, com auxílio do programa SAS (SAS INSTITUTE, 2008). Foram calculados coeficientes de correlação de Spearman entre os dados de diversidade de FMA e parâmetros do solo e as variáveis multicolineares foram removidas das análises posteriores. Os dados dos parâmetros do solo foram submetidos à análise de redundância (RDA) pelo programa CANOCO versão 4.0, a fim de obter variáveis explicativas das modificações da diversidade dos FMA do solo (MOREIRA et al., 2006). Adicionalmente foi realizada uma análise canônica discriminante (ACD) para verificar quais espécies de FMA foram mais relevantes na separação das áreas amostradas (SAS INSTITUTE, 2008). Para saber a contribuição de cada espécie para explicar a variância total e separar as diferentes altitudes, foram calculados os valores de coeficiente de correlação canônica (r), coeficiente canônico padronizado (CCP) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP), a qual é o produto dos coeficientes CCP e r ($TDP = CCP \times r$). As médias do CCP foram comparadas pelo teste LSD ($p < 0,05$).

3.2.2 Resultados

Incluindo as quatro estações e as três altitudes, foram identificados 58 táxons de FMA pertencentes a 18 gêneros (*Ambispora*, *Acaulospora*, *Glomus*, *Fuscutata*, *Intraornatospora*, *Funneliformis*, *Septoglomus*, *Rhizoglomus*, *Racocetra*, *Orbispora*, *Scutellospora*, *Gigaspora*, *Cetraspora*, *Paraglomus*, *Entrophospora*, *Claroideoglomus*, *Viscospora* e *Diversispora*) e 11 famílias (*Ambisporaceae*, *Diversisporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Entrophosporaceae*, *Glomeraceae*, *Dentiscutataceae*, *Gigasporaceae*, *Intraornatosporaceae*, *Racocetraceae*, *Scutellosporaceae* e *Paraglomeraceae*). Dos táxons totais, 64% foram identificados a nível de espécie e 36% foram identificados apenas a nível de gênero (Tabela 3.1).

Um maior número de espécies encontradas pertence ao gênero *Acaulospora* (16 espécies) e *Glomus* (nove espécies), seguido por *Racocetra* (cinco espécies) e *Scutellospora* (quatro espécies). Os gêneros *Entrophospora*, *Diversispora*, *Funneliformis*, *Orbispora*, *Cetraspora*, *Viscospora*, *Rhizoglomus* e *Fuscutata* foram representados por apenas uma espécie. Os gêneros de maior ocorrência foram comuns a todas altitudes, exceto *Scutellospora* que não foi encontrado nos 600m. Alguns gêneros foram exclusivos para uma altitude, como *Entrophospora*, *Diversispora* e *Rhizoglomus* que ocorreram apenas na altitude intermediária (600m), *Septoglomus* que esteve presente apenas em 1000m e *Viscospora*, encontrado apenas na menor altitude (80m). Apenas o gênero *Racocetra* seguiu um padrão altitudinal, aumentando sua ocorrência com o aumento da altitude.

As espécies que apresentaram elevado número de esporos, em todas as épocas, foram: *Acaulospora mellea*, *A. laevis*, *Glomus macrocarpum*, *Ambispora* sp.2 e *Intraornatospora intraornata*. Um grande número de espécies (33%) foi considerado generalista, pois ocorreu em todas as estações e altitudes, enquanto que 25% das espécies foram consideradas exclusivas e o restante das espécies (42%) foi considerado de ocorrência intermediária. Um elevado número de espécies ocorreu na maior altitude (46 espécies) em comparação com a área na altitude intermediária (36) e na menor altitude (35).

O número de espécies pouco diferiu durante o ano (inverno-40, primavera-38, verão-36 e outono-38 espécies). O efeito sazonal sobre as espécies de FMA foi evidente para *Ambispora* sp.1 aff. *A. gerdemanni*, *Racocetra* sp.2 aff. *R. verrucosa*, *Fuscutata heterograma*, *Diversispora ebunea*, *Glomus* sp.3 aff. *G. microaggregatum*, *G. trufemii*, *Viscospora viscosa*, *Septoglomus constrictum*, *Scutellospora aurigloba*, *S. spinosissima* e *Funneliformis mosseae*, uma vez que foram encontradas, embora em pequeno número, apenas em uma estação de amostragem.

No caso de FMA com ampla distribuição em diferentes rizosferas, citam-se *Ambispora* sp.2, *Acaulospora scrobiculata*, *A. morrowiae*, *A. lacunosa*, *Acaulospora* sp.2 aff. *A. lacunosa*, *Acaulospora* sp.3 aff. *A. mellea*, *A. mellea*, *A. laevis*, *Intraornatospora intraornata*, *Racocetra fulgida*, *Gigaspora margarita* e *Paraglomus occultum* que ocorreram em todas as diferentes espécies de plantas hospedeiras. Algumas espécies de FMA foram encontradas apenas na rizosfera de uma planta: *Glomus trufemii* e *Ambispora* sp.1 aff. *A. gerdemannii* no solo rizosférico de *Myrcia spectabilis*, *Acaulospora longula* em *Coussarea* sp., *Intraornatospora* sp.1 em *Bathysa australis* e *Viscospora viscosa* em *Mollinedia schottiana*.

No que se refere à diversidade de esporos de FMA em função da rizosfera de uma mesma planta hospedeira, verificou-se que as espécies hospederias apresentaram um grande número de espécies de FMA em suas rizosferas (Tabela 3.1). Assim, no solo rizosférico de *Euterpe edulis*, *Cecropia glaziovii*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis* foram encontradas, respectivamente, 30, 31, 24, 29, 26, 27 e 35 espécies de FMA.

Tabela 3.1 - Espécies de FMA encontradas no solo rizosférico das plantas (*Euterpe edulis*, *Cecropia glaziovii*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis*), nas três altitudes (E=80m, Q=600m e K=1000m) e nas quatro estações, entre Julho de 2012 e Abril de 2013. Floresta Atlântica (São Paulo, Brasil)

Espécies de FMA		(continuação)																																									
		Euterpe						Cecropia						Guapira						Bathysa						Mollinedia						Coussarea						Myrcia					
		E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K						
Julho/2012 (inverno)																		Outubro/2012 (primavera)																									
Gigaspora sp.1																				4																							
Intraornatospora intraornata				39	10	3				2	2		11	5		10			2	5	31				26	14				4	6			6	6		3	6				5	
Intraornatospora sp.1												2						4																									
Orbispora pernambucana																						3														3							
Racocetra fulgida				8	3	8				2	2		7	6				3	6				13		4		4						10				7						
R. tropicana										2																																	
Racocetra sp.1 aff. R. beninensis				5																				5																			
Racocetra sp.2 aff. R. verrucosa														3																													
Racocetra sp.3				3										3																													
Scutellospora calospora				3										4																													
Scutellospora sp.1														4						6						3																	
Glomerales																																											
Claroideoglomerus etunicatum										4								3		8	4				4				6				4										
Entrophospora infrequens														2																													
Funneliformis geosporus																						4																					
Glomus macrocarpum		9								5		4		6		2						5		4		25		6		5		6		4				15		8		10	
Glomus sp.1 aff. G. australe						3														4																		4					
Glomus sp.2 aff. G. macrocarpum						3														4								5															
Glomus sp.3 aff. G. microaggregatum																						4				6								4									
Glomus sp.4												4		14																4													
Glomus sp.5				3				5																																			
Glomus sp.6				14																																							
Rhizoglomerus clarum												4								14																							

Tabela 3.1 – Espécies de FMA encontradas no solo rizosférico das plantas (*Euterpe edulis*, *Cecropia glaziovii*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis*), nas três altitudes (E=80m, Q=600m e K=1000m) e nas quatro estações, entre Julho de 2012 e Abril de 2013. Floresta Atlântica (São Paulo, Brasil)

Espécies de FMA	(continuação)																				
	<i>Euterpe</i>			<i>Cecropia</i>			<i>Guapira</i>			<i>Bathysa</i>			<i>Mollinedia</i>			<i>Coussarea</i>			<i>Myrcia</i>		
	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K
Janeiro/2013 (verão)																					
<i>Gigasporales</i>																					
<i>Cetraspora</i> sp.1															4						
<i>Fuscutata heterogama</i>																			2		4
<i>Gigaspora margarita</i>						7						6							6	2	10
<i>Intraornatospora intraornata</i>						17				1		4				3		6		6	
<i>Intraornatospora</i> sp.1											4										
<i>Orbispora pernambucana</i>						4															
<i>Racocetra fulgida</i>						4						8							4	3	4
<i>R. tropicana</i>						5													3		
<i>R. verrucosa</i>						6													4		
<i>Racocetra</i> sp.1 aff. <i>R. beninensis</i>																			4		
<i>Scutellospora aurigloba</i>						6															
<i>S. calospora</i>																			3	3	
<i>S. spinosissima</i>																			6		5
<i>Scutellospora</i> sp. 1						7													10	4	6
<i>Glomerales</i>																					
<i>Claroideoglomus etunicatum</i>	4			2	4							3			3			6		1	3
<i>Claroideoglomus</i> sp.1					2																
<i>Entrophospora infrequens</i>					1																
<i>Funneliformis geosporus</i>					2														4		
<i>Funneliformis mosseae</i>					4																
<i>Glomus macrocarpum</i>	4				4							1			3		5		4	3	5
<i>G. trufemii</i>															1						
<i>Glomus</i> sp.2 aff. <i>G. macrocarpum</i>						1									3						

De acordo com os índices ecológicos, a estação do ano não teve nenhuma influência na diversidade (H), dominância (Is) e riqueza de espécies (R) (Tabela 3.2). Entretanto, a variação altitudinal foi responsável por propiciar uma maior diversidade (H) e uma maior riqueza de espécies (R) na maior altitude (1000m). Com relação à diversidade de FMA em cada rizosfera, menores índices de diversidade (H), de dominância (Is) e de riqueza de espécies (R) foram encontrados em *Guapira opposita* e *Coussarea* sp., enquanto as outras espécies de plantas pouco diferiram com relação a esses índices.

Tabela 3.2 - Índices ecológicos: Riqueza de espécies (R), dominância de Simpson (Is) e diversidade de Shannon (H), nas estações de amostragem: Julho/2012(inverno), Outubro/2012(primavera), Janeiro/2013(verão) e Abril/2013(outono), nas altitudes: E (80m), Q(600m) e K(1000m) e em cada espécie de planta hospedeira. Ecossistema de Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil. Letras comparam as estações, altitude e planta hospedeira pelo teste LSD ($p < 0,05$)

Fatores	Riqueza de espécies (R)	Índice de Simpson (Is)	Índice de Shannon (H)
Estação			
Julho/2012 (inverno)	8 a	0,75 a	1,68 a
Outubro/2012 (primavera)	8 a	0,77 a	1,78 a
Janeiro/2013 (verão)	7 a	0,76 a	1,66 a
Abril/2013 (outono)	8 a	0,72 a	1,66 a
Altitude			
80m	9 b	0,76a	1,79b
600m	8 b	0,76a	1,76b
1000m	12 a	0,86a	2,23a
Planta hospedeira			
<i>Myrcia spectabilis</i>	4,45 a	0,61 a	1,21 a
<i>Bathysa australis</i>	4,33 a	0,60 a	1,16 ba
<i>Mollinedia schottiana</i>	3,82 ab	0,57 a	1,07 ba
<i>Cecropia glaziovii</i>	4,22 a	0,58 a	1,17 ba
<i>Euterpe edulis</i>	3,63 ab	0,53 ab	0,97 bc
<i>Guapira opposita</i>	2,92 b	0,45 b	0,83 dc
<i>Coussarea</i> sp.	2,66 b	0,40 bc	0,71 d

A análise canônica discriminante (ACD) indicou que existe uma clara diferença entre as três altitudes, quando considerada a diversidade de FMA (Figura 3.1) e a primeira função canônica discriminante (FCD1) explicou a maior parte da variação total (88%), enquanto que a segunda função canônica discriminante (FCD2) explicou apenas 12%, com alta correlação entre os dois eixos canônicos ($r=0,98$; $p<0,0001$). Considerando as épocas de amostragem, a ACD também indicou que existem diferenças entre as quatro estações do ano, principalmente entre o verão e o inverno. FCD1 explicou 48% da variação total, enquanto FCD2 explicou 32%, e com significativa correlação entre os dois eixos canônicos ($r=0,80$; $p<0,01$).

Figura 3.1 - Relação entre a primeira e segunda função canônica discriminante (FCD1 e FCD2) sobre os coeficientes canônicos padronizados (CCP), referentes aos valores das espécies de FMA: A) nas altitudes: E (80m), Q(600m) e K(1000m) e B) estações do ano: Julho/2012(inverno), Outubro/2012(primavera), Janeiro/2013(verão) e Abril/2013(outono). Ecossistema de Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil

A contribuição individual de cada espécie de FMA para a separação das altitudes é expressa pela taxa de coeficiente de discriminação paralela (TDP), que representa o produto entre os coeficientes canônicos padronizados (CCP) e os coeficientes de correlação canônica (r). Considerando os valores de TDP, poucas espécies de FMA contribuíram para a separação

das altitudes e estação do ano (Tabela 3.3). Para a altitude, em FCD1, os maiores valores de TDP foram verificados para as espécies *Ambispora* sp.3, *Acaulospora* sp.2 aff. *A. lacunosa*, *Racocetra fulgida*, *Septoglomus titan* e *Paraglomus occultum*, e em FCD2, os valores de TDP foram mais elevados para *Ambispora* sp.2, *Acaulospora* sp.2 aff. *A. lacunosa* e *Racocetra fulgida* (Tabela 3.3). Entretanto, para as estações, em FCD1, os maiores valores de TDP foram verificados para *Intraornatospora intraornata*, e em FCD2, TDP foi maior para *Ambispora appendicula*, *Intraornatospora intraornata*, *Racocetra fulgida*, *Glomus* sp.4 e *Cetraspora* sp.1.

Tabela 3.3 - Valores do coeficiente de correlação canônica (r), coeficiente canônico padronizado (CCP) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) dentro da primeira (FCD1) e segunda função canônica discriminante (FCD2), referentes aos valores das espécies de FMA, considerando as altitudes e as estações: São Paulo, Brasil. Espécies de FMA com valores de TDP menores que 0,1 não foram considerados nesta tabela

Espécies de FMA	FCD1			FCD2		
	r	CCP	TDP	r	CCP	TDP
Altitude						
<i>Ambispora</i> sp.2	-0,67	-0,06	0,04	1,37	0,24	0,33
<i>Ambispora</i> sp.3	3,31	0,05	0,16	-1,64	0,01	-0,01
<i>Acaulospora</i> sp.2 aff. <i>A. lacunosa</i>	2,75	0,06	0,15	-1,61	-0,07	0,12
<i>Racocetra fulgida</i>	2,30	0,19	0,43	1,16	0,10	0,11
<i>Septoglomus titan</i>	3,16	0,04	0,13	-0,10	0,03	0,00
<i>Paraglomus occultum</i>	-4,86	-0,02	0,13	1,55	0,02	0,03
Estação						
<i>Ambispora appendicula</i>	0,38	0,09	0,03	0,99	0,15	0,15
<i>Intraornatospora intraornata</i>	0,84	0,14	0,12	0,67	0,16	0,11
<i>Racocetra fulgida</i>	0,30	0,14	0,04	0,62	0,23	0,14
<i>Glomus</i> sp.4	0,52	0,10	0,05	-0,65	-0,16	0,10
<i>Cetraspora</i> sp.1	-0,19	0,02	0,00	1,20	0,11	0,13

O teste de LSD das médias do coeficiente canônico padronizado (CCP), da FCD1 e FCD2 para todas as espécies analisadas aponta que houve diferenças significativas entre as altitudes e estações (Tabela 3.4). De acordo com a FCD1 e FCD2, maiores valores de CCP foram verificados para o inverno e menores valores foram observados para o outono. Quanto à altitude, um maior CCP na FCD1 foi encontrado em K (1000m), no entanto na FCD2, observa-se maior valor de CCP em Q (600m).

Tabela 3.4 - Análise de variância das médias dos coeficientes canônicos padronizados (CCP) da primeira e segunda função canônica discriminante (FCD1 e FCD2), da diversidade de FMA nas estações e altitudes

Fatores	Coeficientes canônicos padronizados	
	FCD1	FCD2
Estação		
Jul/12 (Inverno)	2,5 a*	1,8 a
Out/12 (Primavera)	-1,5 c	0,6 b
Jan/13 (Verão)	1,2 b	0,1 b
Abr/13 (Outono)	-2,2 c	-2,5 c
Altitude		
E(80m)	-3,6 b	-4,4 c
Q(600m)	-8,5 c	3,4 a
K(1000m)	12,1 a	1,0 b

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$).

A análise de redundância (RDA) revelou que oito dos parâmetros do solo analisados (pH, CBM, CO₂, qCO₂, MO, K, Ca e Mg), foram relacionados à composição da comunidade de FMA em cada altitude (Figura 3.2). A explicação total das variáveis canônicas foi de 59%, sendo que desse valor o componente principal 1 explica 40% e o componente principal 2 explica 19%. O diagrama de ordenação resultante (Figura 3.2) indica que algumas espécies como *Rhizoglyphus clarum*, *Acaulospora mellea*, *Ambispora appendicula* e *Ambispora* sp.2 esporularam preferencialmente em um maior pH do solo. *Racocetra fulgida*, *Ambispora* sp.3, *Acaulospora foveata*, *Acaulospora* sp.2 aff. *A. lacunosa* foram mais abundantes em solo com maior conteúdo de Mg e MO, enquanto que *Racocetra* sp.1 aff. *R. beninensis*, *Racocetra* sp.2 aff. *R. verrucosa*, *Scutellospora* sp.1, *S. calospora*, *Glomus* sp.6 e *Acaulospora excavata* foram mais abundantes no solos com maiores teores de CBM, C-CO₂ e MO.

Figura 3.2 - Representação gráfica da Análise de Redundância (RDA) entre as espécies de FMA presentes nas altitudes: E(80m), Q(600m) e K (1000m) e os principais parâmetros do solo: pH, K, Ca, Mg, MO (Matéria orgânica do solo), CBM (Carbono da biomassa microbiana), qCO_2 (quociente metabólico) e C-CO₂ (respiração basal do solo). As espécies: Amapp (*Ambispora appendicula*), Amsp2 (*Ambispora* sp.2), Amsp3 (*Ambispora* sp.3), Acexc (*Acaulospora excavata*), Acfov (*A. foveata*), Aclae (*A. laevis*), Alac (*A. lacunosa*), Acme (*A. mellea*), Actub (*A. tuberculata*), Acsp2 (*Acaulospora* sp.2 aff. *A. lacunosa*), Acsp3 (*Acaulospora* sp.3 aff. *A. mellea*), Acsp4 (*Acaulospora* sp.4 aff. *A. morrowiae*), Acsp5 (*Acaulospora* sp.5), Gimar (*Gigaspora margarita*), Inint (*Intraornatospora intraornata*), Orper (*Orbispora pernambucana*), Raful (*Racocetra fulgida*), Ratro (*R. tropicana*), Rasp1 (*Racocetra* sp.1 aff. *R. beninensis*), Rasp2 (*Racocetra* sp.2 aff. *R. verrucosa*), Scaur (*Scutellospora aurigloba*), Sccal (*S. calospora*), Scsp1 (*Scutellospora* sp.1), Rhclae (*Rhizoglosum clarum*), Cletu (*Claroideoglosum etunicatum*), Glsp6 (*Glomus* sp.6), Glsp3 (*Glomus* sp.3 aff. *G. microaggregatum*) e Setit (*Septoglosum titan*)

A busca no Blast revelou que apenas 10% dos 232 clones sequenciados tiveram alta similaridade com o Filo Glomeromycota. A maioria das sequências foi principalmente relacionada aos Filos Ascomycota e Basidiomycota. Assim, apenas 21 sequências corresponderam aos FMA e 14 filotipos puderam ser verificados (Figura 3.3). Os filotipos encontrados ficaram distribuídos nas diferentes espécies de planta hospedeira, sendo: dois nas raízes de *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana* e *Guapira opposita*, quatro em *Coussarea* sp., três em *Euterpe edulis*, um em *Myrcia spectabilis* e nenhum FMA foi encontrado nas raízes de *Cecropia glaziovii*. Todos os táxons avaliados tiveram alta similaridade com a família Glomeraceae (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Árvore filogenética obtida com o método de neighbor-joining, com base em 18S rRNA SSU de sequências parciais de FMA em raízes amplificadas com primers NS31/AM1. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. Etiquetas começando com EU, GU, BA, MO, CO e MY indicam os clones de FMA isolados de *Euterpe edulis*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis*, respectivamente e a terceira letra seguinte nessas etiquetas indicam as áreas de coleta das raízes: E (80m), Q (600m) e K (1000m), e as outras etiquetas referem-se as sequências de acessos no GenBank que foram mais semelhantes aos clones de FMA obtidos

3.2.3 Discussão

Os FMA são altamente diversificados na porção da Mata Atlântica localizada na Serra do Mar. Nessa área foram encontradas espécies classificadas em 17 dos 38 gêneros conhecidos de FMA, correspondendo a 19% das espécies de FMA descritas em todo o mundo, 41% das espécies identificadas em ecossistemas brasileiros e 76% em áreas de Mata Atlântica. Essa elevada riqueza de espécies (58 espécies) é maior do que foi encontrado em outras áreas de Mata Atlântica brasileira (ANEXO A) e também em outras florestas tropicais: florestas tropicais na Costa Rica (13 espécies) (LOVELOCK et al., 2003), no Sudeste da Ásia

(33 espécies) (SHI et al., 2006), no México (39 e 23 espécies) (GONZÁLEZ-CORTÉS et al., 2012; RODRÍGUEZ-MORELOS et al., 2014) e também em outros ecossistemas no Brasil: em áreas de cerrado (49 espécies) (CARVALHO et al., 2012) e Floresta Amazônia (36 espécies) (LEAL et al., 2013) e no mundo: no vale quente-seco do rio Jinsha, sudoeste da China (43 espécies) (DANDAN; ZHIWEI, 2007), florestas boreais, na Estónia central (34 espécies) (ÖPIK et al., 2008), estepes da Mongólia (27 espécies) (TIAN et al., 2009). No entanto, estudos anteriores realizados no Brasil e no mundo são limitados a um ou dois períodos de amostragem, enquanto que nosso estudo fez-se uma ampla amostragem, cobrindo as quatro estações do ano.

A maior ocorrência dos gêneros *Glomus* e *Acaulospora* encontrados neste estudo corrobora os dados obtidos em outros ecossistemas brasileiros, como revisado em De Souza et al. (2010). Muitas das espécies de FMA encontradas foram comuns a outros estudos realizados em áreas de Mata Atlântica brasileira (ANEXO A). Algumas destas espécies (*Glomus macrocarpum*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Ambispora appendicula*, *Acaulospora foveata* e *A. scrobiculata*) são consideradas generalistas, com ampla distribuição não só na Mata Atlântica, mas também em outros ecossistemas brasileiros (DE SOUZA et al., 2010). O domínio dessas espécies em vários ambientes diferentes indica alta plasticidade e alta adaptação a diferentes impactos de origem biótica ou abiótica (ZANGARO; MOREIRA, 2010). Entre nossas espécies houve algumas que foram encontradas pela primeira vez na Mata Atlântica brasileira (*Acaulospora spinosissima* e *Septoglomus titan*). Este é também o primeiro relato de *Acaulospora spinosissima* no Brasil bem como das espécies *Orbispora pernambucana*, *Septoglomus titan* e *Racocetra tropicana* na Mata Atlântica em São Paulo. Entre as 58 espécies de FMA, seis são, provavelmente, espécies não descritas. Essas evidências apoiam a importância da conservação de áreas naturais, especialmente essa porção da Mata Atlântica que pode ser considerada um hotspot para Glomeromycetos e no entanto, ameaçada no mais alto grau (SOS MATA ATLÂNTICA, 2014), e reforça a urgente necessidade de mais pesquisas sobre a ecologia e a diversidade destes fungos neste ambiente.

As espécies encontradas neste estudo são possivelmente adaptadas a solos com baixo pH e limitando níveis de nutrientes. O pH do solo foi altamente correlacionado com a composição da comunidade de FMA no solo. De fato, este parâmetro foi considerado em estudos anteriores como um fator ambiental chave em moldar a estrutura das comunidades de FMA (TRUFEM, 1990; GOMES; TRUFEM, 1998; STÜRMER et al., 2006; BONFIM et al., 2013), em alguns casos, o efeito do pH do solo parece ser ainda mais importante do que a planta hospedeira para selecionar espécies de FMA (LEKBERG et al., 2011; BAINARD et

al., 2014). Apesar de algumas evidências indicarem relação entre diversidade de FMA e P disponível no solo (HÉGIRA et al., 2006; GOSLING et al., 2013; BAIRNARD et al., 2014), tal fato não foi constatado neste estudo, possivelmente devido ao baixo nível de P encontrado em todos os solos.

Outros autores sugerem que fatores como a textura do solo estão mais relacionados com a estrutura da comunidade dos FMA do que as propriedades químicas do solo (LEKBERG et al., 2007; CARVALHO et al., 2012). No entanto, em nosso estudo, os parâmetros físicos não tiveram influência sobre a comunidade dos FMA. Encontramos uma alta relação de espécies de FMA com parâmetros microbiológicos. Esta relação é ainda pouco estudada e tem sido sugerido que a esporulação de algumas espécies de FMA pode ser estimulada por um aumento da atividade microbiana, provavelmente devido ao aumento do teor de carbono dos solos (ALGUACIL et al., 2014). Um ponto importante a considerar é que a resposta das espécies de FMA para certas características do solo varia entre espécies pertencentes ao mesmo gênero (mostrado pela análise multivariada RDA), pois cada espécie de FMA tem diferentes adaptações e estratégias de sobrevivência para diversos ambientes. Certos filotipos de FMA generalistas são capazes de tolerar uma grande variedade de ecossistemas e têm sido considerados pouco afetados pelas características dos solos (BAIRNARD et al., 2014).

Embora haja um pico da diversidade de espécies arbóreas nas altitudes intermediárias ao longo do gradiente de altitude (JOLY et al., 2012; SANCHEZ et al., 2013), o índice de diversidade indicou uma maior diversidade de FMA na altitude mais elevada. Este resultado está de acordo com outros em que a ocorrência de vários FMA não foi relacionada com a maior diversidade de plantas (STÜRMER et al., 2006; DA SILVA et al., 2014). Diferentes espécies de plantas hospedeiras podem criar seu próprio habitat em torno de suas raízes e levar à criação de espécies de FMA distintas (CARRENHO et al., 2001; CARVALHO et al., 2012). Mas, no nosso caso, há outros fatores ambientais, tais como os parâmetros do solo, por exemplo, que dirigem esta relação. A maior diversidade de FMA verificada na maior altitude contrasta com outros estudos, onde a diversidade de FMA diminui com o aumento da altitude (GAI et al., 2012; LUGO et al., 2012; LI et al., 2014). No entanto, os prévios estudos foram desenvolvidos em regiões montanhosas, onde a altitude é muito maior (acima de 1000m) do que no nosso trabalho. O fato importante é que, em condições brasileiras, a diferença de altitude de 400 metros (1000m menos 600m) foi suficiente para produzir mudanças na comunidade de fungos micorrízicos. Em estudos anteriores realizados nas mesmas áreas também foi possível observar diferenças nas comunidades bacteriana e de arqueas

relacionadas com a variação de altitude (LIMA, 2011; GÓMEZ, 2012). Possivelmente, a maioria das espécies de FMA foi positivamente afetada pelos parâmetros dos solos predominantes na altitude mais elevada, como por exemplo, altas concentrações de matéria orgânica, CBM e C-CO₂, como mostrado pela análise multivariada RDA.

A RDA também foi importante para confirmar que alguns parâmetros do solo estavam associados com as grandes diferenças no comportamento dos FMA nas três altitudes, uma vez que diferentes espécies de FMA tendem a responder de maneira diversa a determinados atributos ambientais (MOREIRA et al., 2009). Assim, devido às condições específicas de cada local, em função dos fatores ambientais e também pelas características e diversidade das árvores que compõem cada porção da topossequência, foi possível observar uma clara separação entre as altitudes para as diferentes espécies de FMA, independentemente da estação do ano. Com a análise dos valores de TDP, encontramos as espécies que mais contribuíram para esta separação. Os valores de TDP atuam como potenciais indicadores sensíveis e têm se tornado uma ferramenta muito adequada para discriminar áreas e por isso são utilizados em diversos estudos ecológicos (MOREIRA et al., 2006).

A sazonalidade, embora não detectada como um fator importante para influenciar a diversidade de FMA, por meio do índice de diversidade de Shannon, determinou a ocorrência de determinadas espécies de FMA em cada estação (de acordo com a análise ACD), como também observado por outros autores (GUADARRAMA et al., 2014; DA SILVA et al., 2014). Realmente, quando se olha para a figura 3.1, pode-se distinguir uma clara separação entre os valores para o verão e inverno, enquanto que os valores que se referem a primavera e outono estão mais misturados. O efeito da variação sazonal na comunidade de FMA pode ser associado com o fluxo de nutrientes do solo e variáveis climáticas (BAIRNAD et al., 2014). Diferenças na esporulação dos FMA durante o ano também são discutidas por outros autores, existindo espécies que ocorrem na maioria dos solos durante todo o ano e outras que ocorrem em grande densidade no solo, mas são restritas a certas épocas do ano (TRUFEM et al., 1994; MOREIRA et al., 2007). Estes resultados confirmam a importância da ampla amostragem (uma em cada estação) durante o ano para obter dados mais precisos e realistas para a distribuição das espécies de FMA em determinados ambientes.

A identidade da planta hospedeira afetou a composição da comunidade de FMA nos solos rizosféricos. Certas espécies de plantas apresentaram uma grande diversidade de espécies de FMA em suas rizosferas e houve também plantas com apenas um tipo de glomerosporo em suas rizosferas. As espécies de FMA que ocorreram em uma maior diversidade de rizosferas sugerem menor especificidade destas em relação aos seus

hospedeiros ou maior suscetibilidade das plantas à colonização micorrízica. Estudos anteriores mostram que a identidade das plantas hospedeiras tem um efeito significativo sobre a diversidade de espécies de FMA e enfatizam que a especificidade do hospedeiro difere entre as espécies de FMA: algumas espécies de FMA não tem especificidade hospedeira, enquanto que outras podem ter especificidade alta ou baixa (TRUFEM, 1990; HUSBAND et al., 2002; OPIK et al., 2009; SMITH; READ, 2008; KIVLIN et al., 2011). Algumas plantas estudadas, como *Euterpe edulis* (ZANGARO et al., 2002; MEDINA et al., 2012) e *Cecropia glaziovii* (ZANGARO et al., 2002) foram avaliadas anteriormente quanto ao seu nível de colonização, no entanto, para a maioria das espécies de plantas, este é o primeiro relato sobre a diversidade de FMA no solo rizosférico. Em estudo prévio, cerca de seis espécies de FMA foram relatadas na rizosfera de *Euterpe edulis* (*Ambispora appendicula*, *Acaulospora foveata*, *A. scrobiculata*, *Funneliformis geosporus*, *Glomus microcarpum* e *G. monosporum*) (TRUFEM et al., 1990). *Cecropia glaziovii* foi uma das espécies de planta hospedeira que apresentou uma grande diversidade de FMA em sua rizosfera. Essa planta já foi descrita como uma das espécies de Mata Atlântica que apresenta baixa seletividade aos FMA, podendo abrigar um grande número de espécies (POUYÚ-ROJAS et al., 2006). Entretanto, apesar de certas espécies de FMA mostrarem ser altamente planta-específicas, num ambiente como o de Mata Atlântica, onde as plantas estão muito próximas uma da outra, o que se tem é um efeito rizosférico combinado das plantas que formam a vegetação da área.

A análise molecular das raízes revela que apesar de ser encontrada uma grande diversidade de FMA no solo rizosférico das plantas hospedeiras, apenas membros da família Glomeraceae estiveram presentes nas raízes. Nós não excluimos a possibilidade da nossa análise molecular, por razões ainda não esclarecidas, não obter uma completa seleção dos FMA presente nas raízes. Portanto, esses estudos devem ser repetidos, talvez usando diferentes metodologias e diferentes iniciadores. Pesquisas recentes mostraram que a planta hospedeira seleciona e determina os parceiros da simbiose através de sinalizadores moleculares presentes nos exsudatos radiciais e que esta pode detectar, discriminar e premiar os melhores parceiros fúngicos com mais carboidratos (KIERS et al., 2011). Semelhante ao estudo em pauta, um domínio na comunidade de FMA por Glomeraceae também foi relatado em outras áreas florestais (HUSBAND et al., 2002; ÖPIK et al., 2008), em pastagens (SANTOS et al., 2006) e em áreas agrícolas (HIRIJI et al., 2006; CHEN et al., 2014). Esporos de Glomeraceae podem mesmo ser raros no solo e, no entanto, colonizar uma grande proporção das raízes, ao passo que esporos de Gigasporaceae produzem preferencialmente

grande biomassa extraradical de hifas no solo (HART; READER, 2002; REDECKER; HIJRI; WIEMKEN, 2003).

Uma menor diversidade de FMA encontrada nas raízes em comparação com o solo rizosférico também tem sido verificada por outros autores (RENKER et al., 2005; HEMPEL et al., 2007; MIRÁS-AVALOS, 2011). Geralmente a análise de FMA presente nas raízes recupera apenas uma pequena fração dos FMA presentes como esporos nos solos (JOHNSON et al., 2003). De fato, o solo contém esporos e micélio extra-radicular; no entanto, dentro das raízes, estão presentes apenas espécies de FMA ativas, que aparecem em um determinado momento (ALGUACIL et al., 2014). Uma grande diversidade de espécies de FMA verificada no solo rizosférico, enquanto apenas uma família esteve presente no interior das raízes pode estar associada a diversos fatores: (1) maior habilidade de espécies de Glomeraceae em colonizar a raiz em comparação com espécies de outras famílias; (2) pelo menos algumas das espécies de FMA encontradas na rizosfera eventualmente apresentam uma forte especificidade hospedeira, sendo incompatíveis com as espécies das plantas examinadas; (3) baixa especificidade dos iniciadores utilizados, uma vez que a maioria das sequências obtidas foi de fungos não-micorrízicos; (4) as quantidades de biomassa de raiz usada para extração de DNA podem não ter sido suficientes para uma completa caracterização da comunidade dos FMA e (5) elevada e diversificada comunidade de outros fungos endofíticos nas raízes (Ascomycota e Basidiomycota) em detrimento dos Glomeromycota, uma vez que estes não foram tão abundantes nas raízes das plantas estudadas, como revelado pela porcentagem de colonização radicular (Ver capítulo 2).

3.3 Conclusões

Nossos resultados evidenciam que a porção da Mata Atlântica localizada na Serra do Mar, região Sudeste do Brasil, pode ser considerada um hotspot para Glomeromycetos e pode contribuir para o conhecimento da diversidade de FMA, não só no Brasil, mas também em todo o mundo.

Para um melhor detalhamento da comunidade de FMA de um determinado ecossistema, fica evidente a importância de uma amostragem mais ampla, cobrindo todas as estações, pois muitas espécies esporulam em determinadas épocas do ano.

A variação na composição de comunidades de FMA entre o solo rizosférico e interior das raízes de diferentes plantas hospedeiras ao longo do gradiente de altitude está relacionada com as análises utilizadas. A análise morfológica foi considerada mais adequada para estudo de diversidade, pois detectou um maior número de espécies.

A diversidade de FMA varia ao longo do gradiente de altitude e algumas condições presentes nas altitudes mais elevadas, como a baixa temperatura, baixos valores de pH e altos níveis de matéria orgânica, carbono da biomassa microbiana e respiração basal do solo podem ter promovido a seleção da maioria das espécies de FMA.

Referências

- AIDAR, M.P.M.; CARRENHO, R.; JOLY, C.A. Aspects of arbuscular mycorrhizal fungi in an Atlantic Forest chronosequence in Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), SP. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 4, p. 1-15, 2004.
- ALEF, K., NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. 576 p.
- ALGUACIL, M.M.; TORRECILLAS, E.; GARCIA-ORENES, F.; ROLDAN A. Changes in the composition and diversity of AMF communities mediated by management practices in a Mediterranean soil are related with increases in soil biological activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 76, p. 34–44, 2014.
- ALTSCHUL, S.F.; THOMAS, L.S.; ALEJANDRO, A.S.; JINGUI, Z.; WEBB, M.; DAVID, J.L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- BAINARD, L.D.; BAINARD, J.D.; HAMEL, C.; GAN, Y. Spatial and temporal structuring of arbuscular mycorrhizal communities is differentially influenced by abiotic factors and host crop in a semi-arid prairie agroecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 88, p. 333–344, 2014.
- BLASZKOWSKI, J. **Glomeromycota**. Kraków: W. Szafer Institute of Botany; Polish Academy of Sciences, 2012. 303 p.
- BONFIM, J.A.; VASCONCELLOS, R.L.F.; STÜRMER, S.L.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian Atlantic forest: a gradient of environmental restoration. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 71, p. 7-14, 2013.
- CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, I. M.; NOGUEIRA, M.A.; MALUCHE BARETTA, C.R.D.; DE PAULA, A.M. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. v. 1, p. 153-215.
- CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosferas de três espécies de fitobiontes instaladas em área de mata ciliar revegetada. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 15, p. 115-124, 2001.
- CARVALHO, F.; SOUZA, F.A.; CARRENHO, R.; MOREIRA, F.M.S.; JESUS, E.C.; FERNANDES, G.W. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 52, p. 9-19, 2012.

CHEN, Y.L.; ZHANG, X.; YE, J.S.; HAN, H.Y.; WAN, S.Q.; CHEN, B.D. Six-year fertilization modifies the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate steppe in Inner Mongolia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 69, p. 371-381, 2014.

DA SILVA, I.R.; DE MELLO, C.M.A.; NETO, R.A.F.; DA SILVA, D.K.A.; DE MELO, A.L.; OEHL, F.; MAIA, L.C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi along an environmental gradient in the Brazilian semiarid. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 84, p. 166–175, 2014.

DANDAN, Z.; ZHIWEI, Z. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hotdry valley of the Jinsha River, southwest China. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 37, p. 118–128, 2007.

DE SOUZA, F.A.; STÜRMER, S.L.; CARRENHO R.; TRUFEM, S.F.B. Classificação e Taxonomia de Fungos Micorrízicos Arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. v. 1, p. 15-75.

GAI, J.P.; TIAN, H.; YANG, F.Y.; CHRISTIE, P.; LI, X.L.; KLIRONOMOS, J.N. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity along a Tibetan elevation gradient. **Pedobiologia**, Amsterdam, v. 55, p. 145–151, 2012.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 46, p. 235-244, 1963.

GIANINAZZI, S.; GOLLOTTE, A.; BINET, M.N.; VAN TUINEN, D.; REDECKER, D.; WIPF, D.. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. **Mycorrhiza**, New York, v. 20, p. 519–530, 2010.

GOMES, S.P.; TRUFEM, S.F.B. Fungos micorrízicos arbusculares (Glomales, Zygomycota) na Ilha dos Eucaliptos, Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 12, p. 393-401, 1998.

GÓMEZ, S.P.M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica**. 2012. 111 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GOSLING, P.; MEAD, A.; PROCTOR, M.; HAMMOND, J.P.; BENDING, G.D. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. **New Phytologist**, Oxford, v. 198, p. 546–556, 2013.

GOTO, B.T. **Aspectos gerais da classificação**. 2014. Disponível em: <<http://glomeromycota.wix.com/lbmicorrizas#!c1/c229i>>. Acesso em: 17 dez. 2014.

GUADARRAMA, P.; CASTILLO, S.; RAMOS-ZAPATA, J.A.; HERNÁNDEZ-CUEVAS, L.V.; CAMARGO-RICALDE, S.L. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: the effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest. **Pedobiologia**, Amsterdam, v. 57, p. 87–95, 2014.

HELGASON, T.; DANIELL, T.J.; HUSBAND, R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W.; Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, London, v. 394, p. 431-431, 1998.

HEMPEL, S.; RENKER, C.; BUSCOT, F. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem, **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1930–1938, 2007

HIJRI, I.; SYKOROVA, Z.; OEHL, F.; INEICHEN, K.; MÄDER, P.; WIEMKEN, A.; REDECKER, D. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 15, p. 2277–2289, 2006.

HUSBAND, R.; HERRE, E.A.; YOUNG, Y.P.W. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 42, p. 131–136, 2002

JOLY, C.A.; ASSIS, M.A.; BERNACCI, L.C.; TAMASHIRO, J.Y.; CAMPOS, M.C.R.; GOMES, J.A.M.A.; LACERDA, M.S.; SANTOS, F.A.M.; PEDRONI, F.; PEREIRA, L.S.; PADGURSCHI, M.C.G.; PRATA, E.M.B.; RAMOS, E.; TORRES, R.B.; ROCHELLE, A.; MARTINS, F.R.; ALVES, L.F.; VIEIRA, S.A.; MARTINELLI, L.A.; CAMARGO, P.B.; AIDAR, M.P.M.; EISENLOHR, P.V.; SIMÕES, E.; VILLANI, J.P.; BELINELLO, R. Florística e fitossociologia em parcelas permanentes da Mata Atlântica do sudeste do Brasil ao longo de um gradiente altitudinal. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 12, p. 1-23, 2012.

KIERS, E.T.; DUHAMEL, M.; BEESETTY, Y.; MENSAH, J.A.; FRANKEN, O.; VERBRUGGEN, E.; FELLBAUM, C.R.; KOWALCHUK, G.A.; HART, M.M.; BAGO, A.; PALMER, T.M.; WEST, S.A.; VANDENKOORNHUYSE, P.; JANS, J.; BÜCKING, H. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. **Science**, Washington, v. 333, p. 880-882, 2011.

KIVLIN, S.N.; HAWKES, C.V.; TRESEDER, K.K. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 2294–2303, 2011

KÖPPEN, W. **Climatologia**. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 479 p.

KÖRNER, C. The use of “altitude” in ecological research. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 22, p. 569–574, 2007.

LEAL, P.L.; SIQUEIRA, J. O.; STÜRMER, S. L. Switch of tropical Amazon forest to pasture affects taxonomic composition but not species abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal community. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 71, p. 72– 80, 2013.

LEKBERG, Y.; MEADOW, J.; ROHR, J.R.; REDECKER, D.; ZABINSKI, C.A. Importance of dispersal and thermal environment for mycorrhizal communities: lessons from Yellowstone National Park. **Ecology**, Washington, v. 92, p. 1292–1302, 2011.

LEKBERG, Y.R.T.; KOIDE, R.; ROHR, J.R.; ALDRICH-WOLFE, L.; MORTON, J.B. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Journal of Ecology**, Malden, v. 95, p. 95-105, 2007.

LI, X.; GAI, J.; CAI, X.; LI, X.; CHRISTIE, P.; ZHANG, F.; ZHANG, J. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with two co-occurring perennial plant species on a Tibetan altitudinal gradient, **Mycorrhiza**, New York, v. 24, p. 95–107, 2014.

LIMA, J.E. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de Mata Atlântica no estado de São Paulo**. 2011. 83 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

LOVELOCK, C.E.; ANDERSEN, K.; MORTON, J.M. Host tree and environmental control on arbuscular mycorrhizal spore communities in tropical forests. **Oecologia**, Marburg, v. 135, p. 268–279 2003.

LUGO, M.A.; NEGRITTO, M.A.; JOFRE, M.; ANTON, A.; GALETTO, L. Colonization of native Andean grasses by arbuscular mycorrhizal fungi in Puna: a matter of altitude, host photosynthetic pathway and host life cycles. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 81, p. 455–466, 2012.

MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, estado de São Paulo**. 2010. 155 p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MEDINA, J.M.; MOREIRA, S.L.S.; ALVES, R.C.; MARTINS, M.L.; CAMPOS, A.N.R. Fungos Micorrízicos Arbusculares em *Euterpe edulis* Martius (Palmeira Juçara) no Município de Rio Pomba/MG. **Vértices**, Campos dos Goytacazes, v. 14, p. 159-167, 2012.

MIRÁS-AVALOS, J.M.; ANTUNES, P.M.; KOCH, A.; KHOSLA, K.; KLIRONOMOS, J.N.; DUNFIELD K. E. The influence of tillage on the structure of the rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Pedobiologia**, Amsterdam, v. 54, p. 235–241, 2011.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Spore density and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in preserved or disturbed *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. ecosystems. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, p. 380-385, 2006.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in native and in replanted *Araucaria* forest. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 66, p. 677-684, 2009.

MOREIRA-SOUZA, M.; TRUFEM, S.F.B.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, p. 211-215, 2003.

MORELLATO, L.P.C.; HADDAD, C.F.B. Introductions: the Brazilian Atlantic forest **Biotropica**, Malden, v. 32, p. 786–792. 2000

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853–858, 2000.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; PALENZUELA, J.; INEICHEN, K.; SILVA, G.A. da. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. **IMA Fungus**, London, v. 2, p. 191–199, 2011.

OEHL, F.; LACZKO, E.; BOGENRIEDER, A.; STAHR, K.; BÖSCH, R.; VAN DER HEIJDEN, M.; SIEVERDING, E. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 724–738, 2010.

ÖPIK, M.; MOORA, M.; ZOBEL, M.; SAKS, Ü.; WHEATLEY, R.; WRIGHT, F.; DANIELL, T. High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. **New Phytologist**, Oxford, v. 179, p. 867–876, 2008.

ÖPIK, M.; ZOBEL, M.; CANTERO, J.J.; DAVISON, J.; FACELLI, J.M.; HIIESALU, J.; JAIRUS, T.; KALWIJ, J.M.; KOOREM, K.; LEAL, M.E.; LIIRA, J.; METSIS, M.; NESHATAEVA, V.; PAAL, J.; PHOSRI, C.; PÕLME, S.; REIER, Ü.; SAKS, Ü.; SCHIMANN, H.; THIÉRY, O.; VASAR, M.; MOORA, M. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, New York, v. 23, p. 411–430, 2013.

PEREIRA, C.M.S.; SILVA, D. K. A. da; FERREIRA, A.C.A.; GOTO, B.T.; MAIA, L.C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Atlantic forest areas under different land uses. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 185, p. 245–252, 2014

POUYÚ-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J.O.; SANTOS, J. G. D. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Lavras v.30, p.413-424, 2006.

RODRÍGUEZ-MORELOS, V.H.; SOTO-ESTRADA, A.; PÉREZ-MORENO, J.; FRANCO-RAMÍREZ, A.; DÍAZ-RIVERA, P. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of seedlings and mature trees of *Swietenia macrophylla* (Magnoliophyta: Meliaceae) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. **Revista Chilena de Historia Natural**, Veracruz, v. 87, p. 1-10, 2014.

SANCHEZ, M.; PEDRONI, F.; EISENLOHR, P.V.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Changes in tree community composition and structure of Atlantic rain forest on a slope of the Serra do Mar range, Southeastern Brazil, from near sea level to 1000 m of altitude. **Flora**, Freiberg, v. 208, p. 184–196, 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, F.E.F.; CARRENHO, R. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em remanescente florestal impactado (Parque Cinquentenário – Maringá, Paraná), Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 2, p. 508-516, 2011.

SANTOS, J.C.; FINLAY, R.D.; TEHLER, A. Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilization gradient. **New Phytologist**, Oxford, v. 172, p. 159-168, 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide version 9.2 (software). Cary, 2008.

SCHENCK, N.C.; PÉREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. 3rd ed. Gainesville: Synergistic, 1990. 250 p.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HATMANN, M. ET AL. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537–7541, 2009.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; MILANEZ, A.I.; TRUFEM, S.F.B.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; GRANDI, R.A.P.; SANTOS, M.L.; GIUSTRA, K.C. Microscopic fungi in the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 267-275, 2006.

SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v. 105, p. 1413-1421, 2001.

SHI, Z.Y.; CHEN, Y.L.; FENG, G.; LIU, R.J.; CHRISTIE, P.; LI, X.L. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the Meliaceae on Hainan island, China. **Mycorrhiza**, New York, v. 16, p. 81–87, 2006.

SILVA, C.F.; PEREIRA, M.G.; SILVA, E.M.R.; CORREIA, M.E.F.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J. Fungos micorrízicos arbusculares em áreas no entorno do Parque Estadual da Serra do Mar em Ubatuba (SP). **Caatinga**, Mossoró, v. 19, p. 1-10, 2006.

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 291-295, 1992.

SMITH, S.E.; READ, D.J. The symbiontes forming arbuscular mycorrhizas. In: _____. (Ed.). **Mycorrhizal symbiosis**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 13-42.

SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. **Mycologia**, Lexington, v. 104, p. 1–13. 2012.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**: período de 2010 a 2011. 2014. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>. Acesso em: 02 dez. 2014.

STÜRMER, S.L.; KLAUBERG FILHO, O.; QUEIROZ, M.H.D.; MENDONÇA, M.M.D. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in soils of early stages of a secondary succession of Atlantic Forest in South Brazil. **Acta Botanica Brasílica**, Belo Horizonte, v. 20, p. 513-521, 2006.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR S. Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TEHLER, A.; LITTLE, D.P.; FARRIS, J.S. The full-length phylogenetic tree from 1551 ribosomal sequences of chitinous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 901–916, 2003.

TIAN, H.; GAI, J.P.; ZHANG, J.L.; CHRISTIE, P.; LI, X.L. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with wild forage plants in typical steppe of eastern Inner Mongolia. **European Journal of Soil Biology**, New Jersey, v. 45, p. 321–327, 2009.

TRUFEM, S.F.B. Aspectos ecológicos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares da mata tropical úmida da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 4, p. 31-45, 1990.

TRUFEM, S.F.B.; VIRIATO, A. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 13, p. 49-53, 1990.

TRUFEM, S.F.B.; MALATINSZKY, S.M.M.; OTOMOI, H.S. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosferas de plantas do litoral arenoso do parque estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Acta botânica brasileira**, Belo Horizonte, v. 8, p. 219-229, 1994.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VAN DER HEIJDEN, M.; KLIRONOMOS, J.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, p. 69-72, 1998.

WALKLEY, A.; BLACK, I.A. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. **Soil Science**, Philadelphia, v. 63, p. 251–263, 1934.

WANG, P.; WANG, Y. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of *Poncirus trifoliata* and *Citrus reticulata* based on SSU rDNA, **The Scientific World Journal**, New York, v. 1, p. 1-9, 2014.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

ZANGARO, W.; MOREIRA, M. Micorrizas arbusculares nos Biomas Floresta Atlântica e Floresta de Araucária. In: SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. v. 1, p. 279-310.

ZANGARO, W.; NISIZAKI, S.M.A.; DOMINGOS, J.C.B.; NAKANO, E.M. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do rio Tibagi, Paraná. **Cerne**, Lavras, v. 8, p. 77-87, 2002.

4 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE EM ÁRVORES DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA EM UM GRADIENTE ALTITUDINAL

Resumo

Os fungos endofíticos dark septate (DSE, do inglês, *dark septate endophytes*) representam um grupo comum de fungos que colonizam as raízes das plantas em diversos ambientes e com variável efeito para as plantas hospedeiras. Este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade de DSE a partir de raízes de sete espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica em um gradiente de altitude localizado a 80, 600 e 1000m. Os DSE foram isolados em três estações do ano (primavera, verão e outono). A identificação dos fungos foi baseada nas sequências de DNA e análise morfológica dos isolados. Para verificar a patogenicidade dos isolados de DSE, instalou-se um experimento de inoculação utilizando arroz (*Oryza sativa*) como planta teste. O fungo que colonizou as raízes sem causar qualquer efeito negativo visível para a planta foi considerado um DSE não patogênico. Foram encontrados 251 isolados que foram agrupados em 35 UTOs, sendo que destes, 14 (que representam cerca de 44% dos isolados) foram considerados não patogênicos num teste prévio. Foram realizadas análises estatísticas multivariadas para verificar a influência da variação da altitude, parâmetros do solo, sazonalidade e planta hospedeira na comunidade dos DSE. Os dados aqui apresentados indicam que os DSE correlacionaram fortemente com a espécie arbórea, com preferência de certos isolados para algumas plantas hospedeiras. Entretanto, a maioria dos DSE foram generalistas e não apresentam qualquer especificidade para uma altitude ou estação. Para o nosso conhecimento, esta é a primeira vez que a diversidade dos DSE é relatada no Brasil. Nós mostramos que algumas árvores da Mata Atlântica são colonizadas por membros comuns dos DSE, anteriormente relatados em outras regiões do mundo. Algumas das sequências encontradas foram impossíveis de serem taxonomicamente classificadas e, provavelmente, correspondem a espécies novas ou espécies que não têm ainda suas sequências depositadas nas bases de dados públicas.

Palavras-chave: Endossimbiose; Solos florestais; Ascomycota; Diversidade de fungos

Abstract

Dark septate endophytes (DSE) fungi represent a common root-colonizing fungal group in several environments and with variable effects on plant growth. This work aimed at studying the DSE diversity in the Atlantic Rain Forest in Serra do Mar Park (SE Brazil), in an altitudinal gradient located at 80, 600 and 1000m a.s.l. DSE were isolated from roots of seven native tree species in three seasons (spring, summer and autumn). Identification of the fungi was based on the DNA sequences of the isolates and on colony morphology. To find out if the isolated fungi belong to the DSE are non-pathogenic we installed an artificial inoculation experiment, using rice (*Oryza sativa*) as test plant, in which we considered the isolate to be non-pathogenic if it colonized the roots without causing any negative effect on the plant. In an analysis of the DNA ITS sequences of the 251 isolates we found that they clustered into 35 OTUs. We found that 14 of these 35 OTUs were non-pathogenic, representing approximately 44% of the isolates. We performed multivariate statistical analyses to verify the influence of altitudinal variation, soil parameters, seasonality and host plant on the DSE community. The data presented here indicate that the fungal community composition correlates most strongly with the plant host, with certain OTUs showing preference for some host plants, whereas the main OTUs are generalists and show no specificity for a study area or season. To our

knowledge, this is the first time that DSE diversity is reported in Brazil. We showed that some trees of the Atlantic Forest are colonized by common members of the DSE community, previously reported from other regions in the world. Many of the sequences found could not be taxonomically classified and are probably new species or species the sequences of which have not been deposited in databases.

Keywords: Fungal endophytes; Forest soils; Ascomycota; Fungal diversity

4.1 Introdução

A maioria das raízes das plantas terrestres (cerca de 80%) está intimamente associada com fungos micorrízicos arbusculares (FMA, filo Glomeromycota) (SCHÜßLER et al., 2001), com muitos aspectos da função ecológica desempenhada por esses fungos já bem compreendidos. Entretanto, além dos FMA, as raízes das plantas abrigam também fungos endofíticos, e entre estes os fungos de micélio escuro (DSE, inglês, *dark septate endophytes*) têm recebido interesse crescente (YUAN et al., 2010). Ao contrário dos FMA, o papel dos DSE no ambiente ainda não está muito claro, com efeitos variáveis para as plantas hospedeiras (MANDYAM; JUMPPONEN, 2015).

Os DSE, em sua maioria Ascomycetos, são caracterizados por possuírem hifas melanizadas e septadas e microescleródios nas raízes (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998). Este grupo de fungos tem sido associado com muitas plantas em todo o mundo, podendo colonizar cerca de 600 espécies de plantas que representam cerca de 320 gêneros e 114 famílias (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; MANDYAM; JUMPPONEN, 2005; NEWSHAM et al., 2011). A presença de hifas melanizadas confere aos DSE vantagens seletivas para sobrevivência em diversos ambientes sob condições de estresse, tais como em solos contaminados por metais pesados (BAN et al., 2012; ZHAO et al., 2015), sob stress hídrico (KNAPP et al., 2012) e em solos ácidos (POSTMA et al., 2007) e geotérmicos (REDMAN et al., 2002).

Apesar de haver um crescente interesse no estudo dos DSE, pesquisas sobre a diversidade desses fungos em ambientes naturais ainda são escassas, o que pode ser devido principalmente aos critérios amplos e ambíguos usados para sua classificação. Devido a ausência de estruturas reprodutivas em meio de cultura, a classificação morfológica da maioria dos DSE torna-se extremamente difícil (SIEBER, 2007). Assim, a utilização de métodos moleculares tem sido uma ferramenta essencial para a identificação das espécies, pois permite uma melhor separação de espécies semelhantes e a identificação torna-se mais confiável (GRÜNIG et al., 2011). Apesar de serem conhecidas desde o século XX, poucas

espécies de DSE foram identificadas até agora (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; ADDY et al., 2005; GRÜNIG et al., 2011). Diversas espécies de fungos de solo são classificadas como DSE e incluem espécies saprófitas, simbióticas e patogênicas das ordens: Helotiales, Chaetothyriales, Pleosporales, Capnodiales, Chaetosphaeriales e Sordariales. Os principais gêneros de DSE são: *Microdochium* [anamórfico de *Monographella* (Xylariales)], *Periconia* (anamórfico de Pleosporales), *Harpophora* (anamórfico de Gaeumannomyces), *Cadophora* (anamórfico de Helotiales), *Cryptosporiopsis* [anamórfico de *Pezicula* (Helotiales)], *Phialocephala* e *Acephala* (ambos anamórficos de Helotiales) (ADDY et al., 2005; SIEBER; GRÜNIG, 2013). No entanto, o papel ecológico da maioria destes táxons ainda é desconhecido.

Árvores de florestas formam associações simbióticas com vários fungos endofíticos e quase todos os estudos sobre a diversidade dos DSE em ecossistemas florestais são desenvolvidos em habitats alpinos e subalpinos de regiões temperadas no hemisfério norte (GRÜNIG et al., 2008). Nesses ecossistemas, espécies como *Phialocephala fortinii* e *Acephala applanata* são encontradas com frequência (SIEBER, 2007; GRÜNIG et al., 2011). Em floresta tropical ainda nenhum estudo sobre a diversidade dos DSE foi realizado. Entre as florestas tropicais, a Mata Atlântica se distingue pela alevada biodiversidade e endemismo (MYERS et al., 2000), além de ser considerada uma área em extinção, ameaçada no mais alto grau, contendo apenas cerca de 7% da vegetação original (SOS MATA ATLÂNTICA, 2014). Neste bioma, a diversidade de flora e fauna é relativamente bem estudada, porém, apesar de sua importante contribuição, a maior parte da diversidade dos fungos permanece inexplorada.

Em nossos estudos sobre o status da colonização micorrízica em diferentes árvores da Mata Atlântica, encontramos raízes tipicamente colonizadas por FMA e a presença de hifas melanizadas e septadas e microescleródios (Ver detalhes no capítulo 2). Devido a sua ocorrência relativamente comum nas raízes, assumimos que os DSE podem desempenhar um papel relevante naquele ecossistema e conhecer mais sobre a diversidade desses fungos em um bioma tão ameaçado como o da Mata Atlântica, pode apresentar resultados relevantes para a conservação e regeneração da floresta tropical. Embora pareça que os DSE estão presentes em todos os principais biomas e climas (MANDYAM; JUMPPONEN, 2005), os estudos sobre a influência de fatores bióticos e abióticos sobre a ocorrência e diversidade dos DSE são raros. A porção da Mata Atlântica localizada no Parque Estadual da Serra do Mar é muito adequada para estudos de diversidade, porque existe uma grande variação de altitude em uma curta distância, que é responsável por diversas alterações ambientais. As mudanças de

temperatura, umidade, composição florística e parâmetros do solo (JOLY et al., 2012), por sua vez, têm grande influência sobre a comunidade de fungos e, entre estes, os DSE.

O presente estudo teve dois objetivos. O primeiro foi conhecer a diversidade dos DSE em sete espécies de árvores presentes na Mata Atlântica da Serra do Mar no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, em um gradiente de altitude (80, 600 e 1000m) em três estações do ano e verificar como esses fungos são influenciados pela variação da altitude, parâmetros do solo, sazonalidade e planta hospedeira. O segundo foi averiguar o caráter patogênico desses fungos em um sistema artificial com inoculação em plantas de arroz (*Oryza sativa*).

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

Área de estudo e amostragem

As áreas florestais estão localizadas no Parque Estadual da Serra do Mar, a maior área remanescente contínua de Mata Atlântica no Brasil. As raízes foram amostradas em parcelas de 1 ha em três altitudes diferentes: E (80m), Q(600m) e K (1000m). A densidade de árvores ao longo do gradiente varia de 70 a 100 espécies ha⁻¹ (JOLY et al., 2012) e os solos nesta topossequência são predominantemente rasos, arenosos, bem drenados e, normalmente, distróficos, com alta diluição de nutrientes e alta saturação de alumínio, sendo classificado como Cambissolo Háptico (MARTINS, 2010). As coordenadas geográficas, tipo de floresta e as características químicas, físicas e microbiológicas do solo de cada parcela nas diferentes altitudes estão apresentadas no capítulo 2.

Foram coletadas amostras de raízes de sete espécies arbóreas mais comuns, encontradas em todas as altitudes, em cada parcela, sendo: *Euterpe edulis* Mart., *Cecropia glaziovii* Snethl., *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, *Bathysa australis* (A.St.-Hil.) Benth. & Hook., *Mollinedia schottiana* (Spreng.) Perkins, *Coussarea* sp. e *Myrcia spectabilis* DC. Para cada espécie vegetal foram amostradas raízes de cinco árvores nas três altitudes. A amostragem foi realizada em todas as áreas na primavera de 2012 e no verão e outono de 2013 (7 espécies de árvores x 5 árvores x 3 altitudes x 3 estações = 315 raízes). Para ter certeza de que as raízes eram realmente da árvore escolhida, seguimos cada raiz do tronco até encontrar raízes mais finas para amostragem. Em cada estação, as raízes foram amostradas da mesma árvore. Além disso, cinco amostras de solo foram retiradas da rizosfera de cada árvore (0-20 cm de profundidade) e estas foram posteriormente misturadas, formando uma amostra

composta (21 amostras compostas por altitude) para avaliação dos parâmetros químicos, físicos e microbiológicos do solo.

Análises química, física e microbiológica dos solos

Dentre os parâmetros do solo, foram determinados o pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} , P disponível, K^+ , Al^{3+} , H+Al e Matéria Orgânica. Os parâmetros microbiológicos determinados foram: Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) e atividade microbiana, determinada através da respiração basal do solo (C-CO_2). O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) que representa a taxa de liberação de C-CO_2 por unidade de C na biomassa microbiana, foi calculado a partir dos resultados de atividade respiratória basal e do CBM. Os dados referentes à análise física do solo foram fornecidos por Martins (2010). Todos os parâmetros do solo foram avaliados segundo metodologia descrita no item 2.2.1 do Capítulo 2.

Isolamento dos fungos DSE

Depois de transportar as raízes em sacos plásticos para o laboratório, as amostras foram armazenadas a 4°C por não mais do que três dias. As raízes foram lavadas com água de torneira e esterilizadas superficialmente por lavagem em solução de hipoclorito de sódio a 2% (90s), etanol 70% (60s), peróxido de hidrogênio a 33% (60s) e água destilada estéril (180s). Em seguida, cada segmento de raiz foi cortado em pedaços de 1-2 cm de comprimento (315 segmentos de raiz x 6 pedaços = 1890 segmentos de raiz) e colocado em placas de petri (6 pedaços em cada placa) com ágar de extrato de malte (AEM): 15g L⁻¹ de ágar e 20g L⁻¹ de extrato de malte, pH 5,8, 100mg L⁻¹ de estreptomicina. Em seguida as placas foram mantidas a 28°C no escuro. Parte do micélio melanizado crescendo em volta dos segmentos de raiz foi transferido para uma nova placa de petri para obter culturas puras. No total, obtemos 251 isolados. Os endófitos que apresentaram morfologia e micromorfologia da colônia muito semelhantes foram considerados idênticos e atribuídos à mesma unidade taxonômica operacional (UTO). Assim, os 251 isolados foram agrupados em 35 UTOs.

Identificação molecular dos isolados

O DNA total dos isolados (1 isolado por UTO) foi extraído utilizando o Kit Promega Wizard® Genomic. Foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores, ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar regiões espaçadoras internas do rDNA (ITS1-5.8-ITS2) (WHITE et al., 1990). Para 50 µL de reação foram utilizados: 5 µL de tampão, 2 µL de MgCl_2 25 mM; 2 µL de

dNTP 10 mM; 1 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador 10 pmol e 0,3 μ L de Taq DNA polimerase 5U. A reação de amplificação foi realizada em termociclador e as condições de amplificação foram: desnaturação inicial (94°C por 1 min), 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1min), anelamento (55°C por 1 min), extensão (72°C por 1 min) e uma extensão final (72°C por 5 min). O sequenciamento parcial dos fragmentos amplificados foi realizado diretamente a partir do produto de PCR utilizando o iniciador ITS1, sendo a corrida realizada em sequenciador 3730xl (Applied Biosystems). As sequências de DNA foram editadas e comparadas com as bases de dados públicas utilizando BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). As relações filogenéticas entre as sequências fúngicas foram inferidas por meio da análise do neighbor joining (NJ) no programa Geneious 6.1.8 (Biomatters Limited, Auckland, New Zealand) que também foi usado para desenhar uma árvore filogenética circular não enraizada dos 35 OTUs.

Teste de patogenicidade

Representantes de cada um dos isolados (35 UTOs) foram utilizados num bio-teste com o arroz (*Oryza sativa*) como plantas hospedeiras para examinar a patogenicidade dos isolados (RIBEIRO et al., 2011; KNAPP et al., 2012). As sementes de arroz foram esterilizadas superficialmente da mesma forma que as amostras de raízes. Após a esterilização as sementes foram pré-germinadas em água-ágar (9g L⁻¹) durante cerca de sete dias, de modo a obter plântulas uniformes e livres de contaminantes. Após esse período as plântulas foram transferidas para tubos de cultura (6 cm de diâmetro) com 300 mL de meio composto por ágar (6g L⁻¹) e solução de Hoagland meia-força (HOAGLAND; ARNON, 1950). Três plântulas de arroz foram transplantadas para cada tubo e inoculadas com três discos de AEM colonizados (3 mm de diâmetro), retirados a partir da margem de colônias com duas semanas de crescimento a 28 °C, além do controle inoculado apenas com AEM estéril. O experimento teve três repetições de cada isolado e os tubos foram incubados em câmara de crescimento com ciclo de 12 h de luz (24°C) e 12 h de escuro (22°C). Cada tubo recebeu 1 ml de água estéril, uma vez por semana (RIBEIRO et al., 2011). As plantas foram verificadas periodicamente e as raízes foram colhidas nove semanas após a inoculação. Os fungos que colonizaram os tecidos radiculares sem prejudicar as mudas foram considerados não patogênicos. A colonização dos segmentos das raízes foi examinada por microscopia após coloração segundo metodologia descrita no capítulo 2.

Análise estatística

Análise multivariada canônica discriminante (ACD) foi aplicada para verificar as principais UTOs responsáveis em distinguir as áreas, estações e plantas hospedeiras usando software SAS, versão 9.1 (SAS INSTITUTE, 2008). O teste LSD ($p < 0,05$) foi aplicado para as diferentes funções canônicas utilizando o coeficiente canônico dos valores médios padronizados (CRUZ-CASTILLO et al., 1994; BARETTA et al., 2008). Os valores dos parâmetros químicos, físicos e microbiológicos do solo foram submetidos à análise de redundância (RDA), utilizando o programa CANOCO versão 4.0 para obter as variáveis explanatórias que estão mais relacionadas com as comunidades dos DSE. Os dados com multicolinearidade foram reduzidos, selecionando-se variáveis com fator de inflação ≤ 20 . O índice de diversidade de Shannon (H) foi estimado para a população de UTOs obtida para cada planta hospedeira, altitude e estação. Os parâmetros químicos, físicos e microbiológicos do solo foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste LSD, $p < 0,05$ (SAS INSTITUTE, 2008).

4.2.2 Resultados

Teste de patogenicidade

Todas as raízes das sete espécies de árvores coletadas no campo apresentaram colonização intrarradicular por hifas septadas e melanizadas e presença de microescleródios. Além disso, as raízes foram geralmente colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (Ver capítulo 2).

No total, 251 cepas de fungos foram isoladas a partir de 1890 segmentos de raiz (Tabela 4.1, sem considerar as diferentes estações do ano). Os isolados foram agrupados em 35 UTOs. Um total de 14 das 35 UTOs colonizaram as raízes de arroz e as plantas pareciam normais e saudáveis. Estas UTOs correspondiam a 110 dos 251 isolados iniciais (44%) (Tabela 4.1, UTO mostrado em negrito).

21 isolados apresentaram efeitos negativos sobre as plantas hospedeiras: plantas inoculadas com nove desses isolados morreram dentro de quatro semanas, oito isolados induziram sintomas de doença, por exemplo, amarelecimento foliar e murchamento e raízes podres e com subdesenvolvimento. Em quatro casos, as mudas de arroz não pareciam diferentes dos controles, mas os fungos não colonizaram as raízes. Nós só incluímos os 14 isolados que não causaram nenhum dano às plantas de arroz em nossos futuros estudos

(Capítulo 5), considerando que isolados não patogênicos ao arroz também podem ser prejudiciais para espécies arbóreas.

Isolados fúngicos

Isolados das UTOs 1 e 9 ocorreram com maior frequência e foram originados de todas as plantas hospedeiras em todas as altitudes e durante todas as estações do ano, com a única exceção da UTO 1 que não foi encontrada em *Myrcia spectabilis*. Isolados das UTO 26, 29 e 30 foram raros, embora estivessem presentes em pelo menos duas altitudes (Tabela 4.1). Todos os isolados, exceto os das UTOs 8, 18 e 20, produziram micélios melanizados e/ou clamidósporos em cultura, no entanto, estes isolados também produziram estruturas melanizadas em raízes, sendo assim, considerados DSE de acordo com a definição de Sieber e Grünig (2013) (Tabela 4.1).

De acordo com o índice de diversidade de Shannon (H) dos DSE, não houve diferenças para a presença desses fungos nas diferentes estações do ano (outono = 1,23; verão = 1,25; primavera = 1,22) e altitudes (80m = 1,30; 600m = 1,21; 1000m = 0,99). No entanto, a diversidade de espécies (H) foi menor em *Coussarea* sp. do que em qualquer outra planta hospedeira (Tabela 4.1). Isolados representativos das ordens Pleosporales, Capnodiales, Trichosphaeriales e Helotiales foram detectados em todas as sete espécies arbóreas nas três altitudes e durante todas as estações. Curiosamente, fungos de Hypocreales (*Nectria* spp.) ocorreram apenas em *Coussarea* sp. e *Bathysa australis*, ambos membros da "família do café" (Rubiaceae). Em contraste, Sordariales foram encontradas apenas em dois hospedeiros independentes *Guapira opposita* e *Bathysa australis* que pertencem às ordens de plantas completamente distintas Nyctaginaceae e Rubiaceae, respectivamente.

Tabela 4.1 - Número de segmentos de raiz colonizados pelos fungos DSE nas árvores (*Euterpe edulis*, *Cecropia glaziovii*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea sp.* e *Myrcia spectabilis*) presentes nas três altitudes (E=80m, Q=600m e K=1000m) no Ecossistema da Floresta Atlântica (São Paulo, Brasil)

Nº da UTO	Espécie do fungo	Micélio melanizado em cultura ¹	Micélio melanizado em raiz ¹	(conclusão)																									Total de segmentos colonizados n=1890
				<i>Euterpe</i>			<i>Cecropia</i>			<i>Guapira</i>			<i>Bathysa</i>			<i>Mollinedia</i>			<i>Coussarea</i>			<i>Myrcia</i>							
				<i>H=0.63a</i>			<i>H=0.52a</i>			<i>H=0.73a</i>			<i>H=0.76a</i>			<i>H=0.78a</i>			<i>H=0.29b</i>			<i>H=0.79a</i>							
E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K	E	Q	K						
20	<i>Diaporthe</i> sp.	-	+											2		1			1	1				6					
21	<i>Phoma</i> sp.3	+	+	1	1			1					1								1			5					
22	<i>Nigrospora</i> sp.2	+	+			2				1		2						1		3	1			1					
23	<i>Alternaria</i> sp.1	+	+									2			1		2							5					
24	<i>Alternaria</i> sp.2	+	+					1	1			1					1							4					
25	<i>Alternaria</i> sp.3	+	+			1	1					3					2			1				8					
26	<i>Helotiales</i> sp.2	+	+													1				2				3					
27	<i>Hypoxylon</i> sp.	+	+					1									1	1		2				5					
28	<i>Phoma</i> sp.4	+	+						2				2					1						5					
29	<i>Exophiala</i> sp.1	+	+					1	2															3					
30	<i>Cladosporium</i> sp.5	+	+							1						1			1					3					
31	<i>Helotiales</i>	+	+	2				1					1			1								5					
32	<i>Leptosphaeria</i> sp.	+	+	2										2		2	2				2			1					
33	<i>Exophiala</i> sp.2	+	+	1									1	1		1								4					
34	<i>Sordariales</i> sp.	+	+									2		3										5					
35	<i>Rhinocladiella</i> sp.	+	+					1									3			1				5					
Total de segmentos colonizados				15	11	7	9	7	9	9	13	19	9	13	20	3	21	18	6	5	10	15	13	19	251				

UTOs dos isolados não patogênicos para as plantas de arroz neste estudo são mostrados em negrito na tabela.

¹UTOs com hifas melanizados ou clamidósporos em cultura e/ou em raízes são consideradas DSE de acordo com Sieber e Grünig (2013).

²Índices de diversidade de Shannon apresentados para cada planta hospedeira, seguidos de letras indicativas do teste LSD ($p < 0,05$).

As sequências de ITS da maioria das UTOs apresentaram elevada similaridade ($\geq 97\%$ de similaridade) com as sequências depositadas no GenBank (Figura 4.1 e ANEXO B). Similaridade menor que 97% ocorreu apenas para as UTOs 8 (94,7%), 19 (85,8%) e 34 (93,5%), ou seja, estas sequências pertencem a espécies de fungos cujas sequências não estão depositadas no GenBank ainda. Consequentemente, estas UTOs só puderam ser agrupadas a níveis taxonômicos mais elevados.

As UTOs encontradas pertencem a nove ordens de Ascomycota: Pleosporales (15 UTOs), Helotiales (três UTOs), Hypocreales (uma UTO), Capnodiales (seis UTOs), Xylariales (uma UTO), Diaporthales (duas UTOs), Chaetothyriales (quatro UTOs), Trichosphaeriales (duas UTOs) e Sordariales (uma UTO) (Figura 4.1). A maior parte das UTOs foi passível de ser identificada ao nível de gênero ou espécie (Figura 4.1 e ANEXO B). Houve algumas exceções: (1) sequências de UTOs sem correspondência no GenBank e (2) sequências de UTOs correspondentes a "fungo não identificado". Por exemplo, as sequências das UTOs 12 e 31 com correspondência mais próxima do GenBank apresentavam uma similaridade de $\geq 97\%$ mas foram depositadas como "fungos não identificados".

Figura 4.1 - Árvore filogenética circular não enraizada baseada nas sequências parciais ITS de cada representante de UTO. Os nomes dos DSE de nosso estudo que não se mostraram patogênicos em testes usando arroz como planta hospedeira, são mostrados em negrito. O tamanho das barras indica o número de substituições.

Análise multivariada

A análise canônica discriminante (ACD) indicou que não houve diferenças significativas entre as altitudes ($r = 0,26$; $p < 0,2874$) e estações do ano ($r = 0,26$; $p < 0,9817$) em relação à diversidade de UTOs (Figura 4.2 A e B), no entanto, há uma clara diferença entre as espécies arbóreas (Figura 4.2 C). A maior diferença existente ocorreu entre as comunidades de DSE das espécies de *Myrcia spectabilis*, *Guapira opposita* e *Bathysa australis*, uma vez que estes hospedeiros tiveram uma distribuição mais distante dos outros ao longo do primeiro eixo da função canônica discriminante (FCD1) (Figura 4.2 C). A FCD1 e FCD2 explicaram 34% e 21% da variação na matriz de dados, respectivamente, e a correlação entre os dois eixos canônicos foi alta ($r = 0,90$; $p < 0,0001$).

Figura 4.2 - Funções canônicas discriminantes 1 e 2 que descrevem a variabilidade na diversidade das comunidades de DSE em diferentes altitudes (A), nas diferentes estações do ano (B) e em sete plantas hospedeiras (*Euterpe edulis*, *Cecropia glaziovii*, *Guapira opposita*, *Bathysa australis*, *Mollinedia schottiana*, *Coussarea sp.* e *Myrcia spectabilis*) (C), em Ecossistema de Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil.

A análise de RDA revelou que dez dos parâmetros do solo avaliados, ou seja, pH, CBM, C-CO₂, qCO₂, MO, K, Ca²⁺, Mg²⁺, CTC e P mostraram correlação com a composição da comunidade dos DSE nas altitudes estudadas (Figura 4.3). A explicação total das variáveis canônicas foi de 57% (eixo 1, 37% e do eixo 2, 20%). As espécies do mesmo gênero e, em alguns casos, espécies da mesma ordem, foram analisadas em conjunto para evitar o excessivo número de zeros. No diagrama resultante (Figura 4.3), a seta indica a direção para uma correlação positiva. Assim, algumas espécies agrupadas como *Exophiala*, *Phoma*, *Microdiplodia* e a espécie de Chaetothyriales ocorreram preferencialmente em solos com maiores valores de C-CO₂ e CO₂. A espécie de Sordariales apresentou uma relação positiva com o pH e P no solo. *Alternaria*, *Nigrospora*, espécies de Diaporthales e espécies não identificadas de Helotiales foram mais abundantes nas áreas com maior CBM, CTC e MO. *Curvularia* e *Ascochyta* tiveram uma relação positiva com Ca, Mg e K.

Figura 4.3 - Representação gráfica da análise de redundância (RDA) entre as comunidades de DSE de vários tipos de floresta localizadas nas altitudes de: 80m, 600m e 1000m e os principais parâmetros do solo: pH, K, Ca, Mg, CTC (capacidade de troca catiônica), MO (matéria orgânica), carbono da biomassa microbiana (CBM), quociente metabólico (qCO₂) e respiração basal do solo (CO₂).

4.2.3 Discussão

Em nossos trabalhos anteriores, quando se analisou a colonização das raízes das árvores da Mata Atlântica, a grande frequência de estruturas características dos fungos DSE chamou a atenção (Capítulo 2). O isolamento dos DSE das raízes confirmou que a ocorrência

desse grupo de fungos é frequente na Mata Atlântica localizada no litoral Norte do Estado de São Paulo, e a distribuição é semelhante a um prévio estudo realizado por outros autores (KNAPP et al., 2012). A maior parte das UTOs foi representada por mais de um isolado em diferentes espécies de plantas, altitudes e estações do ano, o que pode indicar baixa especificidade dos isolados. A alta frequência de isolamento de alguns isolados pode ser o resultado da elevada abundância e adequada técnica de isolamento. Também é importante notar que todos os fungos isolados apresentaram alta similaridade com Ascomycetos, ao qual pertencem os DSE como descrito por Jumpponen e Trappe (1998).

Em nosso estudo, nós consideramos um isolado DSE, se este apresenta micélio septato escuro e/ou se produz estruturas melanizadas como hifas e microescleródios inter e intracelular nas raízes das plantas (SIEBER; GRÜNIG, 2013). Além disso, avaliamos a patogenicidade dos isolados ao inoculá-los em plantas de arroz e verificar se os mesmos provocam algum sintoma da doença visível para as plantas. Com base em nossos resultados, a maioria dos mais frequentes isolados de DSE foram considerados patogênicos. No entanto, apesar da nossa cuidadosa avaliação, ficamos surpresos ao descobrir que a maioria de nossos DSE classificados como não patogênicos pertencem a gêneros que incluem muitos fungos que são patógenos de plantas, como *Cladosporium*, *Phoma*, *Alternaria*, *Curvularia* etc. Nossa hipótese é que talvez algumas das espécies de fungos aqui classificadas como DSE não patogênico causam sintomas da doença para determinadas plantas hospedeiras, enquanto eles agem como endofíticos neutros ou até mesmo favoráveis ao invadir outros hospedeiros.

As UTOs identificadas neste estudo pertencem ao grupo dos Ascomycetos que abrigam os mais frequentes endofíticos colonizadores de raiz, tais como Pleosporales, Hypocreales e Helotiales. Três grupos correspondem a ordem Helotiales, que contém a maioria dos DSE estudados até agora. É amplamente relatado que *Rhizoscyphus ericae*, um membro desta mesma ordem, micorrízico típico, em associação com espécies de plantas ericáceas, aumenta a absorção de N orgânico em solos terrestres ácidos onde seus hospedeiros habitam (SMITH; READ, 2008). *Phialocephala fortinii*, outra espécie da ordem Helotiales, é o DSE mais estudado e também aumenta a absorção de N pelas plantas (ADDY et al., 2005). Este DSE também aumenta a biomassa da raiz e da parte aérea e a concentração de P, que é consistente com a hipótese que estes fungos podem ser capazes de transportar P para as plantas hospedeiras (PETERSON et al., 2008). Dada a ocorrência restrita de *P. fortinii*, uma vez que sua ocorrência até agora foi relatada apenas em regiões temperadas no hemisfério Norte (GRÜNIG et al., 2008; UPSON et al., 2009), outros membros da Helotiales encontrados em nosso estudo como espécies não descritas, podem plausivelmente ter uma

influência significativa sobre a biomassa de plantas e balanço de nutrientes em regiões tropicais.

As interações entre o DSE e seu hospedeiro variam entre espécies de plantas e entre as espécies de fungos envolvidas, muitas vezes pode ocorrer redução no crescimento dos hospedeiros a aumentos significativos na biomassa (MANDYAM et al., 2012). Comprovamos que alguns fungos descritos como DSE podem ser patogênicos para algumas espécies de plantas, como por exemplo, *Cladosporium* sp. (UTOs 2, 10) e *Phoma* sp. (UTOs 21 e 28) para as plantas de arroz. Estes gêneros abrigam muitos patógenos de plantas, entretanto algumas cepas podem favorecer o crescimento vegetal, como por exemplo, cepas de *Cladosporium cladosporioides* podem melhorar a tolerância da planta hospedeira *Astragalus adsurgens* Pall ao estresse com metais pesados (BAN et al., 2012). Para o gênero *Phoma*, espécies dominantes isoladas da planta *Saussurea involucrata* na China (LV et al., 2010), em conjunto com *Cladosporium*, possuem uma atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias patogênicos de humanos (LV et al., 2010). De fato, a presença do DSE *Phoma fimeti* nas raízes da annual grama *Vulpia ciliados* aumenta a biomassa da raiz e parte aérea, comprimento da parte aérea e os números de perfilhos (NEWSHAM, 1994).

Alguns de nossos isolados são fungos colonizadores de raiz bem comuns. UTO 17 tem uma grande similaridade com *Curvularia* sp.. Uma espécie dessa ordem, *Curvularia protuberata*, confere tolerância a elevadas temperaturas geotérmicas na planta *Dicanthelium lanuginosum* (REDMAN et al., 2002). Em outros estudos de inoculação, o mesmo fungo conferiu tolerância ao stresse hídrico e a elevadas temperaturas para várias plantas agrícolas (PENNISI, 2003). UTO 11 compreende *Phaeosphaeria* sp., que é dominante e comum em grama *Bouteloua gracilis* (HERRERA et al., 2010) e já foi comprovada em reduzir o estresse térmico em *Arabidopsis thaliana* através da produção de um inibidor de choque térmico (HSP90) (MCLELLAN et al., 2007). *Microdiplodia* sp. (UTO 15) foi isolado também de *Pinus* sp. no Japão por Hatakeyama et al., (2010), e possui um composto que apresenta atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*. Este composto foi inicialmente isolado de *Phoma* sp. (CHE et al., 2002). As UTOs 29 e 33 são espécies de *Exophiala*, que dentre os gêneros encontrados em nosso estudo é o DSE mais estudado. Algumas espécies de *Exophiala*, como *Exophiala pisciphila*, conferem resistência a plantas que crescem em solos contaminados por metais pesados (ZHAO et al., 2015). O gênero *Exophiala* é filogeneticamente próximo a *Phialophora* (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998), um gênero comum de DSE em ecossistemas temperados.

Alguns DSE não puderam ser classificados, uma vez que as sequências não correspondiam a nenhuma das sequências atualmente disponíveis no banco de dados de DNA. Além disso, eles não esporulam em meio de cultivo, o que é uma característica comum de muitos DSE. Provavelmente eles são espécies novas e não foram estudados anteriormente com maiores detalhes. A identificação dos DSE não é fácil, especialmente quando eles não esporulam. Quando a esporulação ocorre, a identificação é frequentemente possível apenas em nível de gênero, porque às vezes as descrições das espécies não existem ainda ou existem diferenças entre a morfologia do corpo de frutificação em cultura e o produzido na planta hospedeira (SIEBER, 2007). Apesar de não ser possível a identificação de alguns dos isolados neste estudo, os resultados ainda mostram uma grande diversidade dos fungos endofíticos associados às diferentes plantas.

Foi possível verificar uma correlação entre a planta hospedeira e composição da comunidade dos DSE na Mata Atlântica (mostrado pela análise multivariada ACD). Nós mostramos que muitos fungos endofíticos ocorrem em mais de um hospedeiro, com diferentes níveis de ocorrência. Este fato está relacionado às características da planta hospedeira, como, por exemplo, os níveis de componentes de defesa de cada planta: altos níveis de teor de lignina podem ser um meio de limitar a infecção fúngica (BENNETT et al., 2014). No entanto, não há nenhuma evidência óbvia para especificidade de hospedeiro destes fungos endofíticos (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998). Entre as UTOs, existiu apenas uma, a UTO 29, representada por *Exophiala* sp. que foi isolada exclusivamente a partir de uma planta nativa. Os fungos DSE podem ter uma ampla gama de hospedeiros, mas existe uma diferença considerável nas características e nos efeitos dos isolados da mesma espécie (MANDYAM et al., 2012). A ocorrência do DSE em quase todas as plantas hospedeiras sugere que os fungos DSE são generalistas e colonizam várias espécies arbóreas da Mata Atlântica, como mostrado por estudos anteriores em outro ecossistema (KNAPP et al., 2012).

Ao contrário do que foi observado para as plantas, onde a floresta de altitude intermediária (600m) abriga muito mais espécies vegetais do que as florestas nas maiores altitudes (JOLY et al., 2012; SANCHEZ et al., 2013), não encontramos diferenças significativas na diversidade de DSE entre as três altitudes estudadas. Enquanto a colonização por fungos DSE em gradientes de altitude tem sido documentada em vários ecossistemas (RUOTSALAINEN et al., 2004; ZUBEK et al., 2009; RANELLI et al., 2015), este é o primeiro relato que considera a diversidade de DSE na floresta tropical. Alguns autores observaram que a comunidade endofítica da raiz varia em diferentes altitudes e apresenta preferências por um determinado tipo de floresta ao longo da topossequência. Certos fungos

podem ter uma correlação negativa com a altitude como observado para alguns Ascomycetos de Hypocreales e Eurotiales (DEVI et al., 2012) e outros ser indiferentes a variação altitudinal, mesmo com grandes diferenças de altitude (GEMPL et al., 2014a). Assumimos que, devido ao comportamento versátil dos DSE, com sobrevivência em diferentes ambientes com condições extremas (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998), a diversidade dos DSE geralmente é pouco afetada pela variação de altitude.

O pH do solo é conhecido por desempenhar um importante papel na formação da comunidade fúngica. Em nosso estudo muitos DSE mostraram uma relação negativa com o pH do solo. Normalmente, os fungos DSE preferem baixos valores de pH do solo, e uma colonização de DSE mais intensa e maior diversidade foi observada em condições de solo ácidos nas áreas de floresta em montanha, possivelmente devido à sua alta tolerância ao H^+ (POSTMA et al., 2007; GEMPL et al., 2014a). No entanto, nossos dados sugerem que diferentes ordens podem preferir diferentes condições de pH, uma vez que espécie de Sordariales apresentaram uma relação positiva com o pH do solo. Alguns autores encontraram uma correlação positiva entre o pH e espécies do Hypocreales (DEVI et al., 2012; GEMPL et al., 2014a), Cadophora e Exophiala (GEMPL et al., 2014b.) No entanto, em nosso estudo, o pH do solo não se correlacionou com estes grupos de fungos.

Nossos dados mostraram que, além do pH do solo, a composição da comunidade dos DSE também foi correlacionada com o conteúdo de matéria orgânica, BMC, atividade biológica e alguns parâmetros químicos do solo como P, CTC, K, Ca e Mg. Os DSE podem ter sido estimulados por um aumento da atividade microbiana, provavelmente devido ao aumento do teor de carbono dos solos. Relatos anteriores indicam que o aumento do CO_2 pode afetar o funcionamento dos DSE (SIEBER; GRÜNIG, 2006), e algumas evidências indicam que esses fungos têm um efeito positivo mais evidente para o desenvolvimento vegetal quando o solo é enriquecido com CO_2 (ALBERTON et al., 2010). Maior teor de matéria orgânica, BMC e atividade biológica são características das áreas de florestas na maior elevação nesse estudo. Provavelmente os fungos presentes nas altitudes mais elevadas estão mais adaptados a estes parâmetros do solo, como mostrado pela análise RDA para *Alternaria* e *Nigrospora*, espécies dos Diaporthales e a espécie não identificada de Helotiales.

A sazonalidade dos fungos DSE foi abordada em trabalhos anteriores (MANDYAM; JUMPPONEN, 2008; KNAPP et al., 2012). Com base nos resultados de nossa amostragem em diferentes estações do ano, os membros dominantes da comunidade dos DSE não foram restritos a um determinado período do ano, como também observado por Knapp et al. (2012).

No entanto, a compreensão da dinâmica sazonal, funcional e da composição das comunidades dos DSE requerem mais estudos.

4.3 Conclusão

Esta é a primeira vez que a diversidade dos DSE é relatada no Brasil. Trabalhos anteriores sobre a diversidade de endofíticos desenvolvidos no Brasil consideram a comunidade de fungos em geral, e há poucos relatos sobre os fungos que colonizam hospedeiras específicas. Assim, nossos resultados são novos e representam uma contribuição original para a diversidade de DSE na Mata Atlântica brasileira. Com base em nossos resultados, fungos DSE são frequentemente encontrados neste bioma. Este grupo de fungos pode ter várias funções dentro da comunidade de plantas que envolvem não só o efeito nutricional, mas também proteção contra patógenos radiculares nocivos, alteração na tolerância ambiental e envolvimento na dinâmica da comunidade vegetal, que também pode ser de grande relevância para a funcionalidade dos ecossistemas.

Referências

- ADDY, H.D.; PIERCEY, M.M.; CURRAH, R.S. Microfungal endophytes in roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 83, p. 1-13, 2005.
- ALBERTON, O.; KUYPER, T.W.; SUMMERBELL, R.C. Dark septate root endophytic fungi increase growth of Scots Pine seedlings under elevated CO₂ through enhanced nitrogen use efficiency. **Plant and Soil**, The Hague, v. 328, p. 459–470, 2010.
- BAN, Y.; TANG, M.; CHEN, H.; XU, Z.; ZHANG, H.; YANG, Y. The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. **Plos One**, São Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012
- BARETTA, D.; MALUCHE-BARETTA, C.R.D.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Análise multivariada de atributos microbiológicos e químicos do solo em florestas com *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2683-2691, 2008.
- BENNETT, A.E.; GRUSSU, D.; KAM, J.; CAUL, S.; HALPIN, C. Plant lignin content altered by soil microbial community. **New Phytologist**, Cambridge, v. 206, p. 166-174, 2015.
- CHE, Y.; GLOER, J.B.; WICKLOW, D.T. Phomadecalins A-D and phomapentenone A: new bioactive metabolites from *Phoma* sp. NRRL 25697, a fungal colonist of *Hypoxylon stromata*. **Journal of natural Products**, Ohio, v. 65, p. 916–919, 2002.
- CRUZ-CASTILLO, J.G.; GANESHANANDAM, S.; MACKAY, B.R.; LAWES, G.S.; LAWOKO, C.R.O.O.; WOOLLEY, D.J. Applications of canonical discriminant analysis in horticultural research. **HortScience**, Alexandria, v. 29, p. 1115-1119, 1994.

DEVI, L.S.; KHAUND, P.; NONGKHLAW, F.M.W.; JOSHI, S.R. Diversity of culturable soil micro-fungi along altitudinal gradients of Eastern Himalayas. **Microbiology**, New York, v. 40, p. 151–158, 2012.

GEML, J.; PASTOR, N.; FERNANDEZ, L.; PACHECO, S.; SEMENOVA, T.A.; BECERRA, A.G.; WICAKSONO, C.Y.; NOUHRA, E.R. Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 23, p. 2452–2472, 2014a.

GEML, J.; GRAVENDEEL, B.; VAN DER GAAG, K.J.; NEILEN, M.; LAMMERS, Y.; RAES, N.; SEMENOVA, T.A.; DE KNIJFF, PETER.; NOORDELOOS, M.E. The contribution of DNA metabarcoding to fungal conservation: diversity assessment, habitat partitioning and mapping red-listed fungi in protected coastal *Salix repens* communities in the Netherlands. **Plos One**, São Francisco, v. 9, p. 1-17, 2014b.

GRÜNIG, C.R.; QUELOZ V.; SIEBER, T.N.; HOLDENRIEDER, O. Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l.—*Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. **Botany**, Island, v. 86, p. 1355–1369, 2008.

GRÜNIG, C.R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T.N. Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. In: PIRTTILÄ, A.M.; FRANK, C. (Ed.). **Endophytes of forest trees: biology and applications**. Berlin: Springer, 2011. p. 3-30. (Springer Forestry Series, 80).

HATAKEYAMA, T.; KOSEKI, T.; MURAYAMA, T.; SHIONO, Y. Eremophilane sesquiterpenes from the endophyte *Microdiplodia* sp. KS 75-1 and revision of the stereochemistries of phomadecalins C and D. **Phytochemistry Letters**, London, v. 3, p. 148–151, 2010.

HERRERA, J.; KHIDIR, H.H.; EUDY, D.M.; PORRAS ALFARO, A.; NATVIG, D.; SINSABAUGH, R.L. Shifting fungal endophyte communities colonize *Bouteloua gracilis*: effect of host tissue and geographical distribution. **Mycologia**, Lexington, v. 102, p. 1012–1026, 2010.

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

JOLY, C.A.; ASSIS, M.A.; BERNACCI, L.C.; TAMASHIRO, J.Y.; CAMPOS, M.C.R.; GOMES, J.A.M.A.; LACERDA, M.S.; SANTOS, F.A.M.; PEDRONI, F.; PEREIRA, L.S.; PADGURSCHI, M.C.G.; PRATA, E.M.B.; RAMOS, E.; TORRES, R.B.; ROCHELLE, A.; MARTINS, F.R.; ALVES, L.F.; VIEIRA, S.A.; MARTINELLI, L.A.; CAMARGO, P.B.; AIDAR, M.P.M.; EISENLOHR, P.V.; SIMÕES, E.; VILLANI, J.P.; BELINELLO, R. Florística e fitossociologia em parcelas permanentes da Mata Atlântica do sudeste do Brasil ao longo de um gradiente altitudinal. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 12, p. 1-23, 2012.

JUMPPONEN, A. Dark septate endophytes: are they mycorrhizal? **Mycorrhiza**, New York, v. 11, p. 207-211, 2001.

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

KNAPP, D.G.; PINTYE, A.; KOVÁCS, G.M. The dark side is not fastidious – dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. **Plos One**, São Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012.

LV, Y.L.; ZHANG, F.S.; CHEN, J.; CUI, J.L.; XING, Y.M.; LI, X.D.; GUO, S.X. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with the alpine plant *Saussurea involucrata*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 33, p. 1300–1306, 2010

MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root colonizing dark septate endophytic fungi. **Study of Mycology**, Utrecht, v. 53, p. 173–189, 2005.

_____. Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. **Mycorrhiza**, New York, v. 18, p. 145-155, 2008

_____. Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 1-13, 2015

MANDYAM, K.; FOX, C.; JUMPPONEN, A. Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. **Mycorrhiza**, New York, v. 22, p. 109–119, 2012.

MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, estado de São Paulo**. 2010. 155 p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MCLELLAN, C.A.; TURBYVILLE, T.J.; WIJERATNE, E.M.; KERSCHEN, A.; VIERLING, E.; QUEITSCH, C.; WHITESELL, L.; GUNATILAKA, A.A. A rhizosphere fungus enhances Arabidopsis thermotolerance through production of an HSP90 inhibitor. **Plant Physiology**, Washington, v. 145, p. 174–182, 2007.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. da; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853–858, 2000.

NEWSHAM, K.K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 90, p. 783–793, 2011.

PENNISI, E. Fungi shield new host plants from heat and drought. **Science**, Washington, v. 301, p.1466, 2003.

PETERSON, R.L.; WAGG, C.; PAUTLER, M. Associations between microfungi endophytes and roots: do structural features indicate function? **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 86, p. 445–456, 2008.

- POSTMA, J.W.M.; OLSSON, P.A.; FALKENGREN-GRERUP, U. Root colonization by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 39, p. 400–408, 2007.
- RANELLI, L.B.; HENDRICKS, W.Q.; LYNN, J.S.; KIVLIN, S.N.; RUDGERS, J.A. Biotic and abiotic predictors of fungal colonization in grasses of the Colorado Rockies, **Diversity and Distributions**, Oxford, 2015. doi: 10.1111/ddi.12310.
- REDMAN, R.S.; SHEEHAN, K.B.; STOUT, R.G.; RODRIGUEZ, R.J.; HENSON, J.M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, Washington, v. 298, p. 1581, 2002.
- RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, G.M.D.; MOSQUEIRA, C.A.; BARAÚNA, A.C.; VITAL, M.J.S.; SILVA, K.; ZILLI, J.É. Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos dark septate a partir de plantas de arroz. **Agro@mbiente**, Boa Vista, v. 5, p. 97-105, 2011.
- RUOTSALAINEN, A.L.; VARE, H.; OKSANEN, J.; TUOMI, J. Root fungus colonization along an altitudinal gradient in North Norway. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 36, p. 239-243, 2004.
- SANCHEZ, M.; PEDRONI, F.; EISENLOHR, P.V.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Changes in tree community composition and structure of Atlantic rain forest on a slope of the Serra do Mar range, Southeastern Brazil, from near sea level to 1000 m of altitude. **Flora**, Freiberg, v. 208, p. 184–196, 2013.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide version 9.2 (software). Cary, 2008.
- SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v. 105, p. 1413-1421, 2001.
- SIEBER, T.N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology reviews**, v. 21, p. 75–89, 2007.
- SIEBER, T.N.; GRÜNIG, C.R. Biodiversity of fungal root endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* s.l. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T.N. (Ed.). **Microbial root endophytes**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 107–132. (Soil Biology, 9).
- _____. Fungal root endophytes. In: ESHEL, A.; BEECKMAN, T. (Ed.). **Plant roots: the hidden half**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. p. 38-1-38-49.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. The symbiontes forming arbuscular mycorrhizas. In: _____. (Ed.). **Mycorrhizal symbiosis**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 13-42.
- SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**: período de 2010 a 2011. 2014. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>. Acesso em: 02 dez. 2014.

UPSON, R.; NEWSHAM, K.K.; BRIDGE, P.D.; PEARCE, D.A.; READ, D.J. Taxonomic affinities of dark septate root endophytes of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*, the two native Antarctic vascular plant species. **Fungal Ecology**, Cardiff, v. 2, p. 184–196, 2009.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

YUAN, Z.L.; ZHANG, C.L.; LIN, F.C.; KUBICEK, C.P. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulate*) from a nature reserve in Yunnan, China. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, p. 1642–1652, 2010.

ZHAO, D.; TAO, L.; SHENA, M.; WANG, J.; ZHAO, Z. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data. **Microbiological Research**, Jena, v. 170, p. 27–35, 2015.

ZUBEK, S.; BLASZKOWSKI, J.; DELIMAT, A.; TURNAU, KATARZYNA. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte colonization along altitudinal gradients in the Tatra Mountains. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 41, p. 272–279, 2009.

5 INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa*)

Resumo

As plantas normalmente interagem com vários fungos mutualistas e parasitas simultaneamente. Nas raízes das plantas ocorrem tanto fungos micorrízicos arbusculares (FMA) como fungos endofíticos dark septate (DSE). Os FMA são geralmente simbioses benéficos, enquanto o papel funcional dos DSE ainda é pouco conhecido. Este estudo objetivou avaliar os efeitos de quatorze isolados de DSE originados de plantas de Mata Atlântica, como inoculantes simples ou combinados com fungos micorrízicos arbusculares (*Rhizoglyphus clarum*), sobre o desenvolvimento e status nutricional de plantas de arroz (*Oryza sativa*) cultivadas em casa de vegetação. Os controles incluíam tratamentos não inoculados com DSE e FMA e apenas com o FMA. O experimento foi realizado com quatro repetições. Os tratamentos com apenas DSE e os com a presença de *R. clarum* sozinho ou combinado com DSE não afetaram significativamente o crescimento das plantas nas condições experimentais utilizadas. Este fato pode ser atribuído, entre outros fatores, à baixa colonização pelo fungo DSE e as condições fornecidas no experimento que podem não ter favorecido o caráter mutualístico do FMA. Apenas um tratamento, o DSE23 com adição do FMA, apresentou um conteúdo mais elevado de P na parte aérea em comparação com o controle, que pode ser devido a positiva interação dos FMA com os DSE e a elevada percentagem de colonização pelo FMA nesse tratamento. Muitos aspectos da interação FMA-DSE-planta ainda necessitam ser elucidados.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Simbiose; Parasitismo; Efeito nutricional

Abstract

Individual plants typically interact with multiple mutualists and parasites simultaneously. Plant roots encounter both arbuscular mycorrhizal fungi (AM) and dark septate endophytic (DSE) fungi. AMF are usually beneficial symbionts, while the functional role of DSE is largely unknown. This study evaluated the effects of fourteen DSE isolated of plants from Atlantic Forest, as single inoculants or combined with arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizoglyphus clarum*), on the development of rice plants (*Oryza sativa*) grown in the greenhouse. Controls included non-DSE/non-AM fungi and AM fungi alone. Experiments were carried out in four replicates. The presence of *R. clarum* alone or combined with the DSE did not significantly affect plant growth in this experimental setup. This effect may have been attributed, among other factors, to a low colonization by DSE fungus and the experimental conditions that may not have favored the mutualistic nature of the AMF. Only one treatment had a higher content of leaf P when compared to the control, and this can be due to the positive interaction of AMF-DSE and the high percentage of colonization by AMF in this treatment. Many aspects of the interaction AMF-DSE-host plant needs to be further elucidated.

Keywords: Endophytic fungi; Symbiosis; Parasitism, Nutritional effect

5.1 Introdução

É comum em muitos habitats a colonização de raízes por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e endofíticos com hifas septadas escuras, conhecidos como DSE (*dark septate endophytes*). Os FMA, Glomeromycetos, são simbioses já bem conhecidos que absorvem e transferem nutrientes do solo e água para a planta hospedeira, sendo esta associação relatada em uma infinidade de estudos (SMITH; READ 2008; CARDOSO et al., 2010). Os DSE, de estudo recente, são principalmente fungos Ascomycetos, com hifas melanizadas e septadas e esporulam só raramente (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; GRÜNIG et al., 2008; SIEBER; GRÜNIG 2013). Os DSE crescem dentro e entre células epidérmicas e corticais das raízes primárias e secundárias (SIEBER, 2002; SIEBER; GRÜNIG, 2006).

Atualmente, pesquisas sobre os DSE têm recebido cada vez mais interesse, entretanto a maioria dos estudos trata apenas da ocorrência desse grupo de fungos nos mais diversos ambientes (MARINS, 2009; GRÜNIG et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; MASSENSINI et al., 2014). De fato, os DSE são abundantes e têm sido relatados em diversos hospedeiros, compreendendo mais de 600 espécies de plantas (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; JUMPPONEN et al., 2001; GRÜNIG et al., 2011) e em ambientes com condições extremas, como solos contaminados por metais pesados (BAN et al., 2012; ZHAO et al., 2015), com estresse hídrico (KNAPP et al., 2012), salino (WALLER et al., 2005) e com elevada acidez (POSTMA et al., 2007). Sabe-se que a resistência às condições inóspitas são dadas pela presença de melanina em suas hifas (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998).

Apesar desses estudos, pouco se conhece sobre o efeito dos DSE no desenvolvimento da planta hospedeira, e alguns resultados de estudos são contraditórios (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; GRÜNIG et al., 2008; ALBERTON et al., 2010; NEWSHAM, 2011). Já foi comprovado que os DSE protegem as plantas contra patógenos como *Fusarium oxysporum* ou *Rhizoctonia solani* e fornecem P para seu hospedeiro em *Pinus contorta* (JUMPPONEN et al., 1998). Também já foram verificadas respostas à colonização dos DSE no crescimento de mudas de árvores, que variaram de negativas a positivas (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; JUMPPONEN, 2001; TELLENBACH, 2011). Recentemente um estudo em meta-análise com resultados de 18 pesquisas mostrou que os DSE podem ajudar no crescimento e status nutricional das plantas quando o N é fornecido na forma orgânica (NEWSHAM, 2011).

Durante o estudo de colonização radicular por FMA na Floresta de Mata Atlântica, nós encontramos muitas raízes colonizadas por fungos com hifas melanizadas e septadas e microescleródios (Capítulo 2). Devido à frequente colonização, nós assumimos que os DSE

podem ter um importante papel naquele ecossistema e que talvez possam interagir com os FMA e influenciar de alguma forma o estabelecimento das árvores na floresta. Já foi comprovado que a colonização pelo fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* pode compensar os efeitos adversos dos DSE no crescimento de mudas de coníferas *Pseudotsuga menziesii* e *Picea abies* (REININGER; SIEBER, 2012). Os DSE também podem coexistir com os FMA e produzir metabólitos que aumentam a germinação e o crescimento das hifas do fungo micorrízico, beneficiando a planta indiretamente (SCERVINO et al., 2009), ou podem ser responsáveis por efeito negativo na colonização dos FMA, por competir por recursos da planta hospedeira, quando ambos os fungos colonizam o mesmo sistema radicular (PEREZ-NARANJO, 2009).

Apenas um estudo foi realizado testando a interação dos FMA e DSE no crescimento de mudas em condições controladas, e neste a inoculação com o FMA e DSE sozinho ou em combinação pouco contribuiu para o aumento da biomassa da planta (SARAVESI et al., 2014). Como muito pouco ainda se conhece sobre a interação FMA-DSE-planta hospedeira, mais estudos envolvendo esse tema devem ser conduzidos, principalmente com relação aos efeitos dos DSE no desenvolvimento da planta que, diferentemente dos FMA, não dependem da planta hospedeira para o seu desenvolvimento, sendo essa uma importante característica quando se pensa na produção de inoculante.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de fungos DSE isolados de espécies arbóreas da Mata Atlântica, bem como sua interação com o fungo micorrízico *Rhizoglyphus clarum*, quando inoculado em plantas de arroz (*Oryza sativa*).

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Material e Métodos

Característica dos isolados

Os fungos foram isolados de raízes de sete espécies arbóreas presentes na área da Mata Atlântica localizada na Serra do Mar (ver capítulo 4 para maiores detalhes sobre o isolamento). Os fungos isolados categorizados como DSE foram previamente testados quanto ao ser caráter patogênico em arroz (*Oryza sativa*). Assim, dos 35 isolados, 14 foram considerados DSE não patogênicos, pois colonizaram as raízes e não produziram nenhum sintoma de doença visível na planta. Estes isolados foram selecionados para realização do ensaio (Capítulo 4).

Tratamentos e preparo do substrato e sementes

O experimento foi composto por tratamentos nos quais as plantas receberam um dos isolados de DSE, sozinho ou em combinação com o fungo micorrízico *Rhizoglossus clarum*. Os tratamentos controles incluíam plantas que não receberam inoculação (sem DSE e sem FMA) e plantas inoculadas apenas com FMA, totalizando 30 tratamentos. O experimento foi instalado em blocos inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento.

O substrato de crescimento foi preparado com uma mistura de areia e solo (1/4), originalmente pobre em nutrientes, com textura média e a seguinte composição química: Al 1,0 cmol; Ca 1,5 cmol; Mg 0,7 cmol; K 0,2 cmol; H + Al 3,1 cmol; P 7 mg, todos em dm³ de solo; pH 4.9. Foi adicionado 0,3g/kg de Calcário para elevar a saturação de base para 55%. Para evitar outros tipos de colonização microbiana nas raízes, o substrato foi colocado em sacos plásticos e autoclavado duas vezes (121°C, 1h) com um período de incubação de 48 h entre os tratamentos de autoclavagem. Depois dessa etapa, os substratos foram distribuídos em vasos de plástico esterilizados com capacidade de 500 ml.

Nós escolhemos as plantas de arroz (*Oryza sativa*) devido ao seu fácil cultivo e por possuírem raízes receptivas aos fungos em questão (RIBEIRO et al., 2011). Sementes de arroz comercial (cultivar BRS Primavera, arroz de terras altas) foram esterilizadas superficialmente, tal como descrito no capítulo 4 e pré-germinadas em ágar-água durante cerca de sete dias. As plântulas foram transplantadas para o substrato de crescimento já contendo os inóculos. Originalmente, três mudas foram plantadas em cada vaso, mas para uniformização dos tratamentos uma planta foi colhida depois de duas semanas, o que resultou em duas plântulas por vaso.

Inóculo de FMA e DSE

O inóculo do fungo micorrízico consistiu em solo contendo hifas e esporos de *Rhizoglossus clarum*, obtidos a partir de vasos cultivados com *Brachiaria decumbens* inoculadas com o fungo micorrízico. Cada vaso recebeu 2 g de inóculo, contendo em média 100 esporos. Este foi colocado no centro do vaso, 3 cm abaixo da superfície, de acordo com os tratamentos (15 tratamentos receberam o inóculo) um dia antes do transplante das mudas.

Os isolados de DSE foram cultivados durante 3 semanas em meio de cultura ágar de extrato de malte (AEM) em pequenas placas de petri (6 cm de diâmetro). O meio de cultura totalmente coberto pelo crescimento do isolado fúngico de duas placas de Petri foi misturado com 1 L de solo (substrato utilizado nos vasos de plantas) e a mistura foi muito bem agitada para sua homogeneização. Esta mistura foi distribuída nos vasos que correspondiam aos

tratamentos com DSE (SARAVESI et al., 2014). O meio estéril de duas placas com AEM foi misturado em 1 L de substrato para inocular todos os vasos que não receberam os DSE, para produzir um controle válido, evitando o desbalanço de nutrientes no substrato de cultivo das plantas. Um dia antes da inoculação com os FMA, 28 tratamentos receberam os isolados de DSE.

Condições de crescimento das plantas

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação a 28°C de dia e 22° C à noite. Durante todo o experimento, os vasos foram reorganizados semanalmente para minimizar alguma variação nas condições de crescimento no interior da casa de vegetação. As plantas foram regadas diariamente, sendo adicionada em média a quantidade de 200 ml de água destilada em cada vaso a fim de manter a aproximadamente 70% da capacidade máxima de retenção de água do solo. Três semanas após a transplante, todas os vasos receberam 2 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com 1/3 da concentração de P, um procedimento que foi repetido semanalmente.

Colheita e análise de colonização radicular e P foliar

Nove semanas após o plantio as plantas foram atacadas por pragas o que acarretou na eliminação dos tratamentos DSE 5, DSE5+FMA, DSE 12 e DSE12+FMA e também antecipação da colheita. A parte aérea e raiz das plantas foram separadas e secas em estufa a 65°C durante 48 h e depois pesadas. A presença da colonização pelos fungos foi confirmada pela metodologia já descrita no capítulos 2. Após a coloração, as raízes foram preservadas em lactoglicerol à temperatura ambiente. A porcentagem de colonização por FMA e DSE foi quantificada usando o método da placa quadriculada (GIOVANETTI; MOSSE, 1980), em que 100 intersecções por planta foram examinadas.

As amostras secas da parte aérea foram moídas em moinho tipo Willey e submetidas à digestão nitroperclórica e a concentração de P foi determinada pelo método colorimétrico do metavanadato e molibdato, seguindo os procedimentos descritos por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). O conteúdo de P foi determinado considerando-se a concentração de fósforo (mg g^{-1}) e a massa seca da parte aérea de cada planta.

Depois da avaliação da colonização radicular, os tratamentos em que as plantas não foram colonizadas pelos DSE (DSE 7, DSE 23, DSE 25 e DSE 31) foram removidos das análises posteriores. Para verificar os efeitos dos tratamentos DSE com adição do FMA, DSE sozinho e do FMA sozinho, sobre os parâmetros avaliados foi realizada a ANOVA two-way.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.2.2 Resultados

Todas as plantas permaneceram saudáveis, não mostrando nenhum sintoma de doença fúngica visível durante a condução do experimento. Apenas os parâmetros relacionados ao P da parte aérea das plantas de arroz foram significativamente afetados pelos tratamentos com os fungos. A concentração de P da parte aérea foi mais sensível aos efeitos dos tratamentos, sendo afetada pelos tratamentos com FMA e com DSE, enquanto que o conteúdo de P respondeu apenas à inoculação com DSE (Tabela 5.1). A interação entre DSE e FMA foi significativa apenas para a concentração e conteúdo de P (Tabela 5.1). A biomassa da raiz e da parte aérea e a razão raiz/parte aérea não diferiram entre os tratamentos. O peso seco das raízes variou de 0,40 a 1,36 g entre os tratamentos, enquanto que o peso seco da parte aérea variou de 0,6 até 2 g.

Tabela 5.1 – Resultados dos valores de probabilidade P da ANOVA two-way referentes ao efeito dos tratamentos com os fungos sobre parâmetros da biomassa vegetal e P da parte aérea. FMA refere-se à inoculação com fungo micorrízico arbuscular *R. clarum* e DSE refere-se à inoculação com isolados de DSE e FMAxDSE à inoculação com ambos os fungos

Parâmetros	FMA	DSE	FMA x DSE
Biomassa da raiz (g)	0,059	0,207	0,189
Biomassa da parte aérea (g)	0,053	0,169	0,176
Razão raiz/parte aérea	0,347	0,080	0,204
Concentração de P (mg/g)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Conteúdo de P (mg)	0,363	<0,0001	0,001

A concentração de P variou de 0,78 a 0,94 mg g⁻¹ nos tratamentos em que apenas o DSE esteve presente e aumentou para 0,89 a 1,2 mg g⁻¹ com a adição do fungo micorrízico. Foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 5.1 A). Dos 18 tratamentos com DSE, quatro tratamentos não diferiram do controle, enquanto que oito não diferiram do tratamento com apenas o FMA e apenas seis tratamentos mostraram resultados diferentes do tratamento controle, porém com menores concentrações de P em comparação ao controle. Apenas as plantas do tratamento inoculado com o DSE11 e com adição do FMA mostrou um bom resultado, com uma maior concentração de P em comparação ao controle e

ao tratamento com apenas o FMA. No entanto, quando se avaliou o conteúdo de P na parte aérea, apenas o tratamento DSE23+FMA apresentou um conteúdo de P significativamente superior ao controle (Figura 5.1 B).

Figura 5.1 – Concentração (A) e conteúdo (B) de P na parte aérea das plantas de arroz, nos tratamentos com os isolados de DSE com e sem o FMA, apenas com o FMA e controle (sem FMA e DSE). As letras comparam as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A porcentagem de colonização por DSE foi baixa e os valores variaram de 1-6%. Poucas diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos. Apenas foi verificado que os tratamentos DSE23, DSE29+FMA e DSE35+FMA apresentaram maiores porcentagens de colonização quando comparados com o tratamento DSE34 (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Porcentagem de colonização radicular pelo fungo endofítico dark septate (DSE). As letras comparam as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A colonização pelo FMA esteve presente em todas as plantas inoculadas com o fungo micorrízico, e uma maior porcentagem de colonização foi detectada no tratamento DSE23+FMA em comparação com DSE17+FMA e DSE35+FMA (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Porcentagem de colonização radicular pelo fungo micorrízico arbuscular (FMA). As letras comparam as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

5.2.3 Discussão

A interação DSE-FMA-planta, de forma semelhante a qualquer outra interação entre planta e fungo, depende do genótipo dos parceiros envolvidos na associação bem como dos fatores do ambiente. Algumas evidências indicam que os DSE melhoram o crescimento de plantas in vitro (NEWSHAM, 2011), outras indicam efeito neutro, como no presente trabalho, ou negativo sobre o crescimento dos hospedeiros (JUMPPONEN, 2001; SARAVESI et al., 2014). Assim, devido a essa grande variação de resultados, ainda muito pouco é conhecido sobre o papel ecológico dos DSE (NEWSHAM, 2011; MANDYAM; JUMPPONEN, 2015), enquanto que para os FMA, já são bem conhecidos os diversos benefícios que estes fornecem aos seus hospedeiros (SMITH; READ, 2008; CARDOSO et al., 2010). Alguns autores relatam que os DSE podem ser patogênicos para algumas espécies de plantas (BAN et al., 2012) como também observado em nossa pesquisa (capítulo 4), entretanto, nesse estudo, apesar de não ter sido verificado um efeito positivo dos DSE no desenvolvimento das plantas de arroz, todos isolados testados confirmaram o caráter não patogênico para as plantas nas condições fornecidas.

O conhecimento de condições favoráveis para o estabelecimento da simbiose pelos DSE ainda é pequeno. Sabe-se que respostas positivas para o desenvolvimento vegetal podem ser encontradas quando o N é fornecido na forma orgânica (UPSON et al., 2009; NEWSHAM, 2011) ou quando a atmosfera é enriquecida com CO₂ (ALBERTON et al.,

2010). Muitas vezes os DSE são beneficiados por condições extremas do ambiente (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998) ou algum estresse que é fornecido à planta. Saravesi et al., (2014) observaram respostas positivas dos DSE somente quando as plantas foram submetidas à desfolha. Pode ser que as condições fornecidas no experimento não foram adequadas para o estabelecimento da associação mutualística entre as plantas de arroz e os fungos DSE.

A simbiose micorrízica tem sido considerada variável quando observada em diferentes plantas hospedeiras ou quando comparadas diferentes condições bióticas e abióticas (MANDYAM; JUMPPONEN, 2015). A associação do fungo micorrízico nem sempre é mutualística, podendo ocorrer às vezes o parasitismo como observado em plantas de arroz inoculadas com *Cloroidoglossum etunicatum* (MOLTOCARO, 2007) e *R. clarum* (RAIMAM et al., 2007). Em nosso estudo, durante a avaliação da colonização radicular, foi observada uma grande quantidade de esporos do FMA dentro das raízes e pouca presença de hifas e arbúsculos. Pode ser que essas condições contribuíram para dificultar uma eficiente absorção de nutrientes minerais do solo. Em trabalhos semelhantes a este, a baixa biomassa em plantas de arroz inoculadas com o FMA, em comparação ao controle, foi atribuída a um efeito parasítico do FMA, devido à baixa disponibilidade de P e de outros nutrientes no solo utilizado para as plantas (ANTUNES; CARDOSO, 1991; RAIMAM et al., 2007), tal fato também pode ter acontecido no presente experimento.

A colonização pelo FMA na maioria dos casos foi considerada alta e é considerada adequada e semelhante ao que comumente é encontrado em estudos de inoculação com plantas de arroz (RAIMAM et al., 2007; MOLTOCARO, 2007; VALLINO et al., 2014). Já para os DSE, a porcentagem de colonização radicular foi baixa e pode ter sido responsável pela ausência de efeitos dos DSE no desenvolvimento das plantas. De fato, a habilidade de colonizar as raízes dos fungos simbiotes é essencial para promover o crescimento da planta. Na literatura não existe muita informação indicando a porcentagem de colonização pelos DSE em plantas de arroz. Ribeiro et al., (2011) encontraram valores bem superiores aos do presente estudo, com porcentagens que variaram de 38-66%. Não podemos deixar de mencionar que a porcentagem de colonização pelos DSE encontrada em nosso estudo também pode ter sido subestimada, uma vez que, segundo alguns autores, nos estágios iniciais da colonização intracelular pelos DSE, pode ocorrer a presença de hifas não pigmentadas, sendo que a melanina é depositada depois, o que dificulta a avaliação (BARROW, 2003). Assim, se de fato as raízes estavam bem colonizadas pelos DSE, estes fungos possivelmente têm um efeito neutro para as plantas de arroz. Pode ser que as condições fornecidas no experimento, visando beneficiar a associação pelo fungo micorrízico, pode não ter favorecido os DSE. Assim, é

difícil obter respostas significativas quando se visa conhecer esse tipo de interação, em que os fungos têm comportamentos diferenciados. O conhecimento dos mecanismos de colonização e estilo de vida dos DSE e de quais condições devem ser fornecidas em bio-ensaios para beneficiar ambos os endófitos precisa ser alcançado.

Apesar de não ter sido observado aumento significativo na biomassa da planta em função das associações, foi possível encontrar diferenças nos níveis de P foliar. Um interessante efeito no conteúdo de P foliar foi observado para o tratamento (DSE23+FMA, onde DSE 23 corresponde a *Alternaria* sp., (ver capítulo 4). Neste tratamento, as plantas de arroz apresentaram um maior conteúdo de P foliar. Esse fato pode ser decorrente da maior porcentagem de colonização pelo FMA nesse tratamento, uma vez que já é bem conhecido que a presença do fungo micorrízico aumenta a absorção de P pelas plantas (CARDOSO et al., 2010). Com base em nossos resultados é difícil afirmar se os DSE tiveram alguma contribuição para o incremento de P foliar, uma vez que nesse tratamento obtivemos valores bem baixos de colonização pelo DSE. Além disso, observou-se que a inoculação apenas com o isolado de DSE sozinho não melhorou o status nutricional do arroz.

Na literatura já foi reportado aumentos no conteúdo e concentração de P para as plantas inoculadas com o DSE *Phialocephala fortinii* em comparação ao controle (NEWSHAM, 2011). Todavia, sabe-se que os efeitos tanto dos FMA como dos DSE para as plantas vão além dos nutricionais. Os DSE, por exemplo, conferem uma série de benefícios indiretos para seus hospedeiros, como resistência contra agentes patogênicos prejudiciais às raízes e herbívoros (REININGER; SIEBER, 2012; TELLENBACH; SIEBER, 2012), além de garantir a sobrevivência das plantas em condições estressantes (BAN et al., 2012).

5.3 Conclusões

Este estudo tem sua importância pelo caráter inovador. Foi confirmado o caráter não patogênico dos isolados de DSE para as plantas de arroz. Todos os isolados de DSE testados sozinhos ou em combinação com os FMA não aumentaram a biomassa vegetal das plantas de arroz em comparação ao controle. Apenas dois isolados de DSE contribuíram para incrementos de P foliar. Em experimentos de inoculação as condições fornecidas para o estabelecimento da simbiose micorrízica podem não beneficiar a associação pelo DSE. Estudos futuros levando em consideração outras espécies de FMA e DSE, diferentes plantas hospedeiras e outras condições de crescimento são necessários para melhor compreensão dessa interação.

Referências

- ALBERTON, O.; KUYPER, T.W.; SUMMERBELL, R.C. Dark septate root endophytic fungi increase growth of Scots Pine seedlings under elevated CO₂ through enhanced nitrogen use efficiency. **Plant and Soil**, The Hague, v. 328, p. 459–470, 2010.
- ANTUNES, V.; CARDOSO, E.J.B.N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. **Plant and Soil**, The Hague, v. 131, p. 11-19, 1991.
- BAN Y.; TANG, M.; CHEN, H.; XU, Z.; ZHANG, H.; YANG, Y. The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. **Plos One**, São Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012
- BARROW, J.R. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern U.S.A. rangelands. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, p. 239–247, 2003.
- CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, I. M.; NOGUEIRA, M.A.; MALUCHE BARETTA, C.R.D.; DE PAULA, A.M. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. v. 1, p. 153-215.
- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v. 84, p. 489-500, 1980.
- GRÜNIG, C.R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T.N. Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. In: PIRTTILÄ, A.M.; FRANK, C. (Ed.). **Endophytes of forest trees: biology and applications**. Berlin: Springer, 2011. p. 3-30. (Springer Forestry Series, 80).
- GRÜNIG, C.R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T.N.; HOLDENRIEDER, O. Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l.—*Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. **Botany**, New York, v. 86, p. 355–1369, 2008.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California Press, 1950. 31 p.
- JUMPPONEN, A. Dark septate endophytes: are they mycorrhizal? **Mycorrhiza**, New York, v. 11, p. 207-211, 2001.
- JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J.M. Dark-septate root endophytes: a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 140, p. 295-310, 1998.
- JUMPPONEN, A.; MATTSON, K.G.; TRAPPE, J.M. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. **Mycorrhiza**, New York, v. 7, p. 261-265, 1998.

KNAPP, D.G.; PINTYE, A.; KOVÁCS, G.M. The dark side is not fastidious – dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. **Plos One**, São Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012.

MARINS, J.F. de; 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, p. 13-19, 2009.

MANDYAM, K.G.; JUMPPONEN, A. Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 1-13, 2015.

MASSENSINI, A.M.; BONDUKI, V.H.A.; TÓTOLA, M.R.; FERREIRA, F.A.; COSTA, M.D. Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants, **Mycorrhiza**, New York. v. 24, p. 153–159, 2014.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.

MOLTOCARO, R.C.R. **Pigeon-pea and mycorrhiza for phosphate rock utilization by rice under greenhouse conditions**. 2007. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2007.

NEWSHAM, K.K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 90, p. 783–793, 2011.

PEREIRA, G.M.D.; RIBEIRO, K.G.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; VITAL, M.J.S.; KASUYA, M.C.M.; ZILLI, J.É. Ocorrência de fungos endofíticos “dark septate” em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 331-334, 2011.

PEREZ-NARANJO, J.C. **Dark septate and arbuscular mycorrhizal fungal endophytes in roots of prairie grasses**. 2009. 117 p. Thesis (PhD in Sciences) - University of Saskatchewan, Saskatoon, 2009.

POSTMA, J.W.M.; OLSSON, P.A.; FALKENGREN-GRERUP, U. Root colonization by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 39, p. 400-408, 2007.

RAIMAM, M.P.; ALBINO, U.; CRUZ, M.F.; LOVATO, G.M.; SPAGO, F.; FERRACIN, T.P.; LIMA, D.S.; GOULART, T.; BERNARDI, C.M.; MIYAUCHI, M.; NOGUEIRA, M.A.; ANDRADE, G. Interaction among free-living N-fixing bacteria isolated from *Drosera villosa* var. *villosa* and AM fungi (*Glomus clarum*) in rice (*Oryza sativa*). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 25-34, 2007.

REININGER, V.; SIEBER, T.N. Mycorrhiza reduces adverse effects of dark septate endophytes (DSE) on growth of conifers. **Plos One**, São Francisco, v. 7, p. 1-10, 2012.

RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, G.M.D.; MOSQUEIRA, C.A.; BARAÚNA, A.C.; VITAL, M.J.S.; SILVA, K.; ZILLI, J.É. Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos dark septate a partir de plantas de arroz. **Agro@mbiente**, Boa Vista, v. 5, p.97-105, 2011.

SARAVESI, K.; RUOTSALAINEN, A.L.; CAHILL, J.F. Contrasting impacts of defoliation on root colonization by arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Medicago sativa*. **Mycorrhiza**, New York, v. 24, p. 239–245, 2014.

SCERVINO, J. M.; .Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 41, p. 1753-1756, 2009.

SIEBER, T.N.; GRÜNIG, C.R. Fungal root endophytes. In: ESHEL, A.; BEECKMAN, T. (Ed.). **Plant roots: the hidden half**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2013, p. 38-1-38-49.

SMITH, S.E.; READ, D.J. The symbiontes forming arbuscular mycorrhizas. In: _____. (Ed.). **Mycorrhizal symbiosis**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 13-42.

TELLENBACH, C.; SIEBER, T.N. Do colonization by dark septate endophytes and elevated temperature affect pathogenicity of oomycetes? **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 82, p. 157–168, 2012.

TELLENBACH, C.; GRÜNIG, C.R.; SIEBER, T.N. Negative effects on survival and performance of Norway spruce seedlings colonized by dark septate root endophytes are primarily isolate-dependent. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 13, p. 2508-2517, 2011.

UPSON, R.; NEWSHAM, K.K.; BRIDGE, P.D.; PEARCE, D.A.; READ, D.J. Taxonomic affinities of dark septate root endophytes of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*, the two native Antarctic vascular plant species. **Fungal Ecology**, v.2, p.184–196, 2009.

VALLINO, M.; FIORILLI, V.; BONFANTE, P. Rice flooding negatively impacts root branching and arbuscular mycorrhizal colonization, but not fungal viability. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 37, p. 557–572, 2014.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J.; BECKER, K.; FISCHER, M.; HEIER, T.; HÜCKELHOVEN, R.; NEUMANN, C.; VON WETTSTEIN, D.; FRANKEN, P.; KOGEL, K.H. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 13386-13391, 2005.

ZHAO, D.; TAO, L.; SHENA, M.; WANG, J.; ZHAO, Z. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data. **Microbiological Research**, Jena, v. 170, p. 27–35, 2015.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Nossos resultados evidenciam que a porção da Mata Atlântica localizada na Serra do Mar, região Sudeste do Brasil, apresenta uma elevada diversidade de Glomeromycetos, maior do que anteriormente encontrada nesse bioma.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e os dark septate (DSE), foram encontrados com frequência nas espécies arbóreas estudadas, sendo que os FMA foram mais abundantes que os DSE em todas as altitudes e estações.

Os parâmetros químicos e microbiológicos do solo, altitude, bem como a planta hospedeira influenciaram a ocorrência e diversidade dos FMA ao longo do gradiente altitudinal. Devido a essa influência, algumas espécies foram mais adaptadas a determinados ambientes, sendo muitas vezes capazes de discriminar os ecossistemas estudados.

O estudo da diversidade dos DSE foi pioneiro no Brasil. Foram descritas espécies de DSE presentes em raízes de árvores da Mata Atlântica, além de isolados que não puderam ser classificados com o uso de métodos moleculares.

A maioria das espécies de DSE mostrou ocorrência generalizada mesmo nas maiores altitudes e nas diferentes espécies arbóreas e estações, estando sua diversidade mais relacionada com as espécies arbóreas envolvidas na associação.

A sazonalidade afetou principalmente a diversidade dos FMA. A ampla amostragem dos FMA (quatro vezes por ano) não tem sido utilizada com frequência em áreas de Mata Atlântica e foi importante para recuperar um grande número de espécies de FMA, algumas das quais parecem ser espécies ainda não descritas pela ciência.

Utilizando o arroz (*Oryza sativa*) como planta hospedeira, vários isolados de DSE mostraram-se patogênicos a esta planta-teste. Dentre os isolados não patogênicos apenas um combinado com o FMA contribuiu para um incremento no conteúdo de P na planta.

Considerações finais

Estudos de diversidade são de grande importância principalmente quando são desenvolvidos em ambientes tão ameaçados como o da Mata atlântica, que por ser ainda pouco estudado abrigam espécies novas, ainda não descritas. Assim esse estudo vai contribuir para o conhecimento da ocorrência e diversidade de FMA e DSE não só no Brasil, mas também em todo o mundo.

Embora a identificação dos FMA pelo método molecular representa, sem dúvida, um grande progresso em estudos de diversidade, e por enquanto é a única maneira de descrever os

fungos dentro das raízes, nesse estudo consideramos que o emprego dessa metodologia mostra-se problemática por vários motivos. Primeiramente a inexistência de iniciadores com elevado grau de especificidade faz com que muitos grupos não-glomeromycota sejam amplificados, que mais tarde resulta em um excessivo gasto com sequenciamento. A avaliação de um pequeno segmento da raiz pode não ser suficiente para uma identificação mais completa da comunidade dos FMA. E, além disso, a metodologia molecular é cara, trabalhosa e exige muita experiência e tempo do pesquisador. Acreditamos que o uso de novos primers ou outras modificações na metodologia poderão vir a sanar os problemas observados no presente trabalho.

Perspectiva futura

Para um melhor entendimento da dinâmica dos FMA e DSE nos ecossistemas, além dos atributos analisados, outros aspectos ecológicos de cada ambiente devem ser considerados. Um completo detalhamento da diversidade de FMA e DSE de um ecossistema exige um trabalho mais criterioso, levando em consideração também diferentes profundidades visto que uma análise das camadas mais superficiais pode estar encobrindo espécies presentes nas camadas mais profundas. Sugere-se também a análise de outros parâmetros do solo que podem estar relacionados à ocorrência de determinadas espécies fúngicas, como por exemplo, atividade enzimática, temperatura, fauna do solo etc.

Aconselha-se que para facilitar a identificação dos FMA por morfologia devem ser utilizadas culturas armadilhas em casa de vegetação visando à obtenção de esporos em melhores condições morfológicas.

Como sabemos, a aplicação de FMA no campo ainda é considerada um processo difícil devido a vários fatores, necessitando ainda de muitos avanços científicos nessa área. Entretanto, o nosso trabalho representa mais um passo para conhecer as principais espécies de FMA associadas às plantas da Mata Atlântica e os parâmetros do solo que estão influenciando a ocorrência de determinadas espécies de FMA no campo. Tal conhecimento permite ter uma idéia de quais espécies se adaptarão melhor a determinadas plantas e às características do solo presentes em cada ambiente. Essas informações podem ser importantes para auxiliar na escolha da espécie de FMA para inoculação das espécies arbóreas usadas em áreas que estão em processos de revegetação.

Quanto aos DSE, se de fato esses fungos podem contribuir para o melhor desenvolvimento das plantas, agora já conhecemos algumas das espécies fúngicas associadas às diferentes plantas hospedeiras. A seleção de isolados categorizados como DSE não

patogênicos auxiliará em pesquisas posteriores visando conhecer os efeitos destes fungos para a promoção de crescimento vegetal. Testes de patogenicidade para os DSE devem ser também aprimorados, provavelmente com a substituição do arroz por outras plantas hospedeiras ou ainda pela utilização simultânea de outras hospedeiras que sejam responsivas tanto aos FMA quanto aos DSE. Futuros estudos devem ser conduzidos envolvendo as espécies de DSE mais conhecidas e estudadas no mundo, *Phialocephala fortinii* e *Acephala applanata*, e os nossos isolados originados da Mata Atlântica. Diferentes condições ambientais devem ser fornecidas para obter respostas mais relevantes com relação à aplicação desses fungos.

APÊNDICES

Apêndice A - Espécies de FMA presentes nas áreas estudadas: A) *Scutellospora calospora*; B) *Ambispora* sp. (provavelmente espécie nova); C) *Pacispora* sp. e D) *Acaulospora mellea*

Apêndice B – Colônias de fungos DSE em meio de cultura: A) *Phoma* sp., B) Helotiales (espécie não identificada) e C) *Cladosporium* sp

ANEXOS

Anexo A - Espécies de FMA mais abundantes em ecossistema de Mata Atlântica Brasileira e espécies de FMA que foram comuns nesse trabalho e em outros ecossistemas de Mata Atlântica no Brasil, São Paulo, 2015

Estudos	Local	Espécies de FMA mais abundantes	Número de espécies encontradas	Espécies comuns
Trufem; Viriato (1990)	<i>Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, SP</i>	<i>Acaulospora foveata, Scutellospora heterogama, Glomus macrocarpum, Scutellospora aurigloba e Scutellospora calospora</i>	16	7
Trufem (1990); Trufem et al. (1994)	<i>Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP</i>	<i>Ac. foveata, Acaulospora scrobiculata, Glomus etunicatum, Glomus geosporum, Gl. macrocarpum, Glomus microcarpum, Acaulospora mellea, Sc. calospora, Scutellospora coralloidea, Scutellospora gilmorei, Scutellospora persica e Gigaspora gigantea</i>	35 e 24	10 e 8
Gomes; Trufem (1998)	<i>Floresta da Ilha dos Eucaliptos, Represa de Guarapiranga, SP</i>	<i>Ac. foveata, Gl. macrocarpum e Scutellospora erythropha</i>	21	8
Carrenho et al. (2001)	<i>Mata ciliar revegetada, Moji-Guaçu, SP</i>	<i>Acaulospora tuberculata, Gl. macrocarpum, Glomus claroideum, Glomus invermaium, Glomus occultum</i>	22	14
Moreira-Souza (2003)	<i>Floresta de Araucária, São Paulo</i>	<i>Acaulospora leavis, Ac. gerdemannii, Gigaspora margarita, Gl. etunicatum, Gl. macrocarpum, Entrophospora colombiana</i>	24	9
Aidar et al., (2004)	<i>Parque Estadual Turístico do Alto da Ribeira, SP</i>	<i>Acaulospora spinosa, Glomus versiforme, Gl. etunicatum, Gl. heterosporum, Gl. macrocarpum, Glomus invermaium</i>	29	12
Schoenlein-Crusius et al., (2006)	<i>Cubatão, São Paulo</i>	<i>Não lista no trabalho</i>	45	16
Moreira et al., (2007; 2009)	<i>Floresta de Araucária, SP</i>	<i>Gl. macrocarpum, Entrophospora colombiana, G. etunicatum, Scutellospora sp.1</i>	27 e 26	10 e 11
Stürmer et al., (2006)	<i>Áreas da sucessão secundária da Floresta Atlântica, SC</i>	<i>Acaulospora delicata, Glomus glomerulatum, Entrophospora colombiana e Ac. scrobiculata</i>	18	6
Silva et al., (2006)	<i>Parque Estadual da Serra do Mar em Ubatuba, SP,</i>	<i>Ac. mellea, G. macrocarpum, Ambispora appendicula, Ac. foveata e Ac. scrobiculata</i>	30	8
Santos; Carrenho et al., (2011)	<i>Parque Cinquentenário, Maringá, PR</i>	<i>G. macrocarpum, Glomus constrictum, Gl. etunicatum, G. geosporum, G. claroideum, G. sinuosum</i>	50	10
Pereira et al., (2012)	<i>Floresta de Araucária, SP</i>	<i>Amb. appendicula, Ac. mellea, Ac. foveata, Ac. scrobiculata, Ac. lacunosa. Ac. koskei,</i>	36	8
Bonfim et al., (2013)	<i>Mata ciliar, Interior de SP</i>	<i>Ac. mellea, Ac. scrobiculata, Glomus sp.</i>	23	6
Pereira et al., (2014)	<i>Remanescentes de Mata Atlântica, PE</i>	<i>Orbispora pernambucana, Gl. macrocarpum, Glomus coremioides</i>	50	21

Anexo B – Sequências do BLAST com similaridade mais próximas dos isolados de DSE

(continua)

UTO nº	Ordem	Sequência mais similar (Acesso)	Similaridade	Count
1	Capnodiales	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (JX981454)	98.8	27
		<i>Cladosporium</i> sp. (HG008746)	98.8	16
		<i>Cladosporium</i> cf. <i>cladosporioides</i> (HM148053)	98.8	10
		<i>Cladosporium delicatulum</i> (HM148079)	98.8	9
		<i>Cladosporium cucumerinum</i> (HM148068)	98.8	6
		<i>Cladosporium tenuissimum</i> (JQ781836)	98.8	2
		<i>Cladosporium phaenocomae</i> (JF499837)	98.8	2
2	Capnodiales	<i>Cladosporium perangustum</i> (JF499835)	100	9
		<i>Cladosporium hillianum</i> (HM148097)	100	2
		<i>Cladosporium myrtacearum</i> (HM148116)	100	2
		<i>Cladosporium colombiae</i> (KC339772)	100	1
		<i>Cladosporium delicatulum</i> (JQ732934)	100	1
		<i>Cladosporium asperulatum</i> (HM147998)	100	1
		<i>Cladosporium chalastoporoides</i> (HM148001)	100	1
3	Pleosporales	<i>Ascochyta</i> sp. (AM901802)	98.6	4
		Uncultured fungus clone (GU721693)	98.2	20
		<i>Ascochyta hordei</i> (GU237887)	98.0	2
		<i>Dothideomycetes</i> sp. (JQ761084)	98.0	1
		<i>Didymella</i> sp. (JX981474)	97.2	1
		<i>Ascochyta sorghi</i> (KC989097)	96.6	2
4	Pleosporales	<i>Ascochyta</i> sp. (AM901802)	99.4	3
		<i>Pleosporales</i> sp. (GU721693)	99.3	19
		<i>Ascochyta sorghi</i> (KC989097)	97.2	2
		<i>Dothideomycetes</i> sp. (JQ761084)	98.8	1
		<i>Ascochyta hordei</i> (GU237887)	98.8	1
		<i>Phoma</i> sp. (FJ228201)	98.3	2
5	Pleosporales	<i>Phoma</i> sp. (JN207318)	99.6	8
		<i>Leptosphaeria coniothyrium</i> (AB665314)	99.0	2
		Uncultured fungus clone (KF800539)	98.8	15
		<i>Phoma medicaginis</i> (KF293988)	98.8	1
		<i>Peyronellaea glomerata</i> (GU062254)	98.8	5
6	Pleosporales	<i>Coniothyrium sidae</i> (KF251149)	100	1
		<i>Pleosporales</i> sp. (HQ649828)	98.4	10
		<i>Alternaria</i> sp. (GU934500)	98.3	14
		<i>Diaporthales</i> sp. (JQ905810)	98.1	1
		<i>Ascomycota</i> sp. (KJ598862)	97.8	1
		<i>Phaeosphaeria</i> sp. (KC339214)	95.4	4
7	Pleosporales	<i>Phoma</i> sp. (JN207293)	99.4	11
		<i>Peyronellaea prosopidis</i> (KF777181)	99.1	1
		<i>Phoma glomerata</i> (AY183371)	99.1	1
		<i>Pleosporales</i> sp. (EU490145)	99.1	3
		<i>Mycosphaerella pinodes</i> (FJ194522)	99.1	1
		<i>Peyronellaea pinodes</i> (FJ194523)	99.1	1

Anexo B – Sequências do BLAST com similaridade mais próximas dos isolados de DSE

(continuação)

UTO nº	Ordem	Sequência mais similar (Acesso)	Similaridade	Count
8	Hypocreales	<i>Thelonectria beijingensis</i> (KC153720)	94.7	10
		<i>Nectria</i> sp. (HQ897813)	90.6	2
		<i>Thelonectria</i> sp. (JQ836656)	90.8	1
		<i>Neonectria discophora</i> (GQ921725)	93.3	3
		<i>Thelonectria discophora</i> (HM054136)	89.9	4
		<i>Nectria pinea</i> (FJ560438)	89.6	6
		<i>Thelonectria lucida</i> (JQ836657)	92.6	54
		<i>Nectria lugdunensis</i> (KC153759)	87.4	1
9	Trichosphaeriales	<i>Nigrospora</i> sp. (HQ631070)	99.6	26
		<i>Trichosphaeriales</i> sp. (HM537065)	98.1	2
		<i>Nigrospora sphaerica</i> (JQ936183)	97.7	8
		<i>Khuskia oryzae</i> (JX179222)	97.7	7
		<i>Nigrospora</i> sp. (KC954151)	97.9	13
10	Capnodiales	<i>Cladosporium</i> sp. (JQ863243)	100	14
		<i>Cladosporium delicatulum</i> (HM991279)	100	4
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> (GU721269)	100	41
		<i>Cladosporium colombiae</i> (AB678201)	100	6
		<i>Cladosporium oxysporum</i> (JX270582)	99.6	1
		<i>Cladosporium</i> cf (KC339772)	99.6	1
		<i>Cladosporium asperulatum</i> (KC339776)	99.6	1
11	Pleosporales	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i> (EU680559)	100	17
		<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i> (JX496013)	100	2
		<i>Paraphaeosphaeria</i> sp. (JX496047)	100	1
		<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i> (JX496059)	100	3
		<i>Paraphaeosphaeria pilleata</i> (KF367518)	89.7	1
		<i>Paraphaeosphaeria angularis</i> (DQ132840)	89.4	1
12	Helotiales	Uncultured Leotiomycetes clone (HM230871)	97.7	68
		<i>Leotiomycetes</i> sp. (KF572441)	96.8	4
		Mycorrhizal fungal sp. (EU880590)	98.3	22
		Ascomycota sp. (HM190130)	95.0	2
13	Chaetothyriales	<i>Cladophialophora chaetospora</i> (JF691242)	97.3	28
		<i>Cladophialophora boppii</i> (JN655632)	98.6	16
		<i>Cladophialophora</i> sp. (EU035403)	90.7	6
		<i>Cladophialophora</i> sp. (GU566223)	90.2	8
		<i>Herpotrichiellaceae</i> sp. (AY634154)	90.6	4
		<i>Cladophialophora carrionii</i> (HQ608155)	89.7	1
14	Pleosporales	<i>Dokmaia monthadangii</i> (JX998716)	98.4	31
		<i>Phoma</i> sp. (DQ780454)	98.4	3
		Pleosporales sp. (KF646102)	98.3	6
		Ascomycota sp. (HQ649851)	98.3	3
		<i>Leptosphaeria</i> sp. (HQ607946)	98.2	2
		<i>Dokmaia</i> sp. (KF746148)	98.3	8
		<i>Perisporiopsis</i> sp. (HQ008923)	98.0	3

Anexo B – Sequências do BLAST com similaridade mais próximas dos isolados de DSE

(continuação)

UTO nº	Ordem	Sequência mais similar (Acesso)	Similaridade	Count
15	Pleosporales	<i>Aporospora terricola</i> (KC292905)	99.1	8
		<i>Microdiplodia</i> sp. (EU076924)	98.6	4
		<i>Microdiplodia miyakei</i> (FJ462760)	99.0	4
		<i>Epacris microphylla</i> (AY268195)	98.9	1
16	Capnodiales	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (KJ596320)	99.4	7
		<i>Cladosporium oxysporum</i> (KC339776)	99.4	3
		<i>Cladosporium delicatulum</i> (JQ732936)	99.4	1
		<i>Cladosporium</i> sp. (JQ732889)	99.4	11
		<i>Cladosporium</i> sp. (JQ863241)	99.4	1
		<i>Cladosporium colocasiae</i> (HM148067)	99.4	3
		<i>Cladosporium tenuissimum</i> (HM148197)	99.4	6
		<i>Cladosporium</i> cf. <i>tenuissimum</i> (HM148217)	99.4	5
17	Pleosporales	<i>Curvularia</i> sp. (HQ631061)	99.0	9
		<i>Curvularia</i> sp. (HM161984)	99.0	11
		<i>Cochliobolus geniculatus</i> (EU680530)	99.0	5
		<i>Bipolaris sorghicola</i> (JN634838)	99.0	2
		<i>Curvularia affinis</i> (JX960580)	99.0	3
		<i>Curvularia lunata</i> (GU073105)	98.9	3
		<i>Curvularia aeria</i> (JQ360963)	98.9	1
18	Diaporthales	<i>Cytospora</i> sp. (JN153082)	99.2	8
		<i>Phomopsis</i> sp. (DQ872669)	98.7	13
		<i>Diaporthe woolworthii</i> (KC343245)	94.7	1
		<i>Diaporthe</i> sp. (KC145913)	94.1	18
		<i>Diaporthe phaseolorum</i> (EU272524)	93.9	4
		<i>Diaporthe nothofagi</i> (JX862530)	93.4	1
		<i>Diaporthe neoviticola</i> (KC145840)	93.4	5
		<i>Diaporthe padi</i> (KC343170)	94.1	2
		<i>Diaporthe citri</i> (KC357531)	93.3	26
19	Capnodiales	<i>Cladosporium</i> sp. (HG008746)	85.8	8
		<i>Cladosporium</i> sp. (KF212251)	85.8	89
		<i>Cladosporium tenuissimum</i> (AJ300331)	85.8	1
		<i>Cladosporium herbarum</i> (FN868485)	85.8	1
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> (GU566222)	85.8	1
20	Diaporthales	<i>Diaporthe</i> sp. (EF488448)	98.9	10
		<i>Phomopsis</i> sp. (EF488379)	98.9	18
		<i>Ascomycota</i> sp. (KJ476159)	97.2	1
		<i>Phomopsis asparagi</i> (JQ070364)	98.8	25
		<i>Diaporthe phaseolorum</i> (AF001026)	95.1	2
		<i>Diaporthe citri</i> (KC357534)	95.4	26
		<i>Diaporthe perijuncta</i> (KC343172)	95.5	1
21	Pleosporales	<i>Phoma</i> sp. (HE608801)	99.0	7
		<i>Pleosporales</i> sp. (HE608802)	99.0	1
		<i>Peyronellaea calorpreferens</i> (HM769278)	99.0	1
		<i>Boeremia exigua</i> (AB456575)	99.0	1
		<i>Phoma glomerata</i> (EU273521)	99.0	2

Anexo B – Sequências do BLAST com similaridade mais próximas dos isolados de DSE

(continuação)

UTO nº	Ordem	Sequência mais similar (Acesso)	Similaridade	Count
		<i>Peyronellaea prosopidis</i> (KF777181)	98.6	1
		<i>Leptosphaeria coniothyrium</i> (AB665314)	98.6	1
22	Trichosphaeriales	<i>Nigrospora</i> sp. (JX559554)	99.4	28
		<i>Khuskia oryzae</i> (FJ904917)	99.3	21
		Trichosphaeriales sp. (HM537065)	96.7	1
		<i>Nigrospora sphaerica</i> (JQ936183)	96.5	1
		<i>Sordariomycetes</i> sp. (JX179222)	96.5	5
23	Pleosporales	<i>Alternaria alternata</i> (KJ002063)	99.6	14
		<i>Alternaria tenuissima</i> (KJ082100)	99.6	19
		<i>Alternaria</i> sp. (HG008743)	99.6	4
		<i>Alternaria brassicicola</i> (KF542551)	99.6	4
		<i>Alternaria alstroemeriae</i> (AB678214)	99.6	1
		<i>Alternaria arborescens</i> (JN634832)	99.6	2
24	Pleosporales	<i>Alternaria alternata</i> (KJ002063)	100	6
		<i>Alternaria tenuissima</i> (KJ082100)	100	6
		<i>Alternaria</i> sp. (HG008743)	100	6
		<i>Alternaria alstroemeriae</i> (AB678214)	100	1
		<i>Alternaria arborescens</i> (KC464334)	100	3
25	Pleosporales	<i>Alternaria alternata</i> (KJ002063)	100	6
		<i>Alternaria tenuissima</i> (KJ082100)	100	4
		<i>Alternaria</i> sp. (HG008743)	100	6
		<i>Alternaria alstroemeriae</i> (AB678214)	100	1
		<i>Alternaria arborescens</i> (JQ936187)	100	2
26	Helotiales	<i>Leohumicola</i> sp. (GQ160179)	99.0	20
		<i>Helotiales</i> sp. (FJ528692)	98.9	58
		<i>Leohumicola minima</i> (AY706329)	98.2	1
		<i>Leotiomycetes</i> sp. (JQ759640)	97.3	2
		<i>Leohumicola verrucosa</i> (AY706320)	96.6	1
27	Xylariales	<i>Xylariales</i> sp. (HE608800)	97.1	41
		<i>Sordariomycetes</i> sp. (JX157873)	97.1	10
		<i>Hypoxylon fragiforme</i> (EU715619)	95.3	15
		<i>Hypoxylon investiens</i> (KC968924)	97.1	3
		<i>Xylaria</i> sp. (GQ414524)	92.7	3
		<i>Xylariaceae</i> sp. (KF466190)	97.1	7
		<i>Hypoxylon</i> (KJ412993)	97.4	14
28	Pleosporales	<i>Phoma</i> sp. (HE608801)	99.4	10
		<i>Pleosporales</i> sp. (HE608802)	99.4	2
		<i>Phoma medicaginis</i> (KF293988)	98.9	1
		<i>Boeremia exigua</i> (AB456575)	99.8	1
		<i>Peyronellaea prosopidis</i>	99.6	1
		<i>Leptosphaeria coniothyrium</i>	99.6	2
		<i>Phoma glomerata</i>	99.8	2
		<i>Peyronellaea calorpreferens</i>	99.8	1

Anexo B – Sequências do BLAST com similaridades mais próximas dos isolados de DSE

				(conclusão)
UTO nº	Ordem	Sequência mais similar (Acesso)	Similaridade	Count
29	Chaetothyriales	<i>Exophiala pisciphila</i> (DQ826739)	99.8	33
		<i>Exophiala</i> sp. (HQ850428)	98.4	20
		Fungal endophyte (EU797525)	97.8	1
		<i>Exophiala equina</i> (JF747078)	93.0	1
		Ascomycota sp.	93.0	2
		<i>Cadophora fastigiata</i> (AB190392)	93.0	2
		<i>Exophiala salmonis</i> (GU586858)	92.9	5
30	Capnodiales	<i>Cladosporium</i> sp. (KF367474)	99.6	25
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> (EF577236)	99.6	8
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (GU017501)	99.6	4
		<i>Davidiella tassiana</i> (AY361982)	99.6	1
31	Helotiales	Leotiomycetes sp. (KF572441)	96.9	4
		Ascomycota (HM190130)	95.0	2
		Fungi (UDB002662)	97.0	1
		Cistella (UDB004127)	95.7	1
32	Pleosporales	<i>Leptosphaerulina chartarum</i> (KC879283)	99	34
		<i>Leptosphaerulina</i> sp. (HQ026491)	98.9	14
		<i>Dothideomycetes</i> sp. (JQ905830)	98.8	1
		<i>Leptosphaerulina trifolii</i> (KJ190940)	95.4	1
		<i>Didymellaceae</i> sp. (KC871035)	95.4	4
		<i>Pleosporales</i> sp. (JQ026212)	95.4	4
33	Chaetothyriales	<i>Exophiala equina</i> (JF747078)	100	22
		<i>Exophiala</i> sp. (AB488490)	100	34
		<i>Cadophora fastigiata</i> (AB190392)	100	5
		Ascomycota sp. (GU566289)	98.5	3
		<i>Exophiala salmonis</i> (GU586858)	98.5	2
		<i>Exophiala pisciphila</i> (JN650535)	99.8	1
		<i>Exophiala aquamarina</i> (JF747080)	99.6	1
34	Sordariales	<i>Sordariomycetes</i> sp. (AY699691)	93.5	4
		<i>Dendrosporium</i> sp. (JQ272461)	90.9	2
		<i>Sordariales</i> sp. (AY699695)	88.8	6
		<i>Fimetariella rabenhorstii</i> (JF440592)	88.5	3
		<i>Humicola grisea</i> var. <i>grisea</i> (AY706334)	87.2	1
		<i>Trichocladium asperum</i> (AY706336)	87.2	3
		<i>Trichocladium</i> sp. (JX270451)	87.2	2
35	Helotiales/ Chaetothyriales	<i>Rhinocladiella</i> sp. (HE608796)	100	13
		<i>Rhinocladiella similis</i> (KC254071)	100	5
		<i>Exophiala</i> sp. (AB701674)	99.8	8
		<i>Rhinocladiella atrovirens</i> (JX966554)	100	5
		<i>Exophiala spinifera</i> (AB488492)	99.8	35
		<i>Leptodontidium elatius</i> (AY598893)	99.4	1
		<i>Exophiala oligosperma</i> (AY231163)	94.7	12