

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**BRUNA FURLAN SANTAREM**

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE UM FUNGO MICORRÍZICO  
ANTÁRTICO**

**São Gabriel  
2015**

**BRUNA FURLAN SANTAREM**

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE UM FUNGO MICORRÍZICO  
ANTÁRTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Margeli Pereira  
Albuquerque

**São Gabriel  
2015**

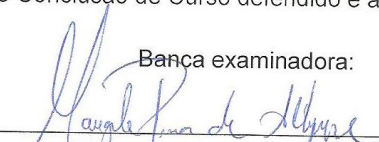
BRUNA FURLAN SANTAREM

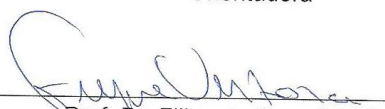
CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE UM FUNGO MICORRÍZICO  
ANTÁRTICO

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Biotecnologia  
da Universidade Federal do Pampa, como  
requisito parcial para obtenção do Título  
de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 23/01/15

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup> Margeli de Pereira Albuquerque  
Unipampa  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria  
Unipampa

  
\_\_\_\_\_  
Ma. Graciéle Cunha Alves  
Unipampa

Dedico este trabalho aos meus pais, que nunca mediram esforços para a conquista dos meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico este trabalho primeiramente, a minha mãe Elsia e ao meu pai Luis Carlos, pois confiaram em mim e me deram esta oportunidade de concretizar e encerrar mais uma caminhada da minha vida. Sei que eles não mediram esforços pra que este sonho se realizasse, sem a compreensão, ajuda e confiança deles nada disso seria possível hoje. A eles além da dedicatória desta conquista dedico a minha vida.

Aos meus amigos, que me apoiaram e que sempre estiveram ao meu lado durante esta longa caminhada, em especial a minha amiga Fernanda Souto, que muitas vezes compartilhei momentos de tristezas, alegrias, angústias e ansiedade, mas que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me ajudando.

A Dr<sup>a</sup> Margeli, pelos ensinamentos durante todo o processo de elaboração desse trabalho, orientação, motivação e paciência.

A todos os professores da Unipampa que participaram da minha formação por todo o conhecimento transmitido.

A todos os integrantes amigos do NEVA, pelo companheirismo, incentivo e pelo auxílio durante esses anos de coleguismo. A minha co-orientadora Graciéle Alves pela atenção e auxílio.

Muito Obrigada!

O conhecimento exige uma presença curiosa do sujeito em face do mundo. Requer uma ação transformadora sobre a realidade. Demanda uma busca constante. Implica em invenção e em reinvenção.

Paulo Freire

## RESUMO

A biota da Antártica, mais do que outros continentes, é dominada por microrganismos, como os fungos. A distribuição dos fungos no continente Antártico está relacionada com os substratos, tais como solos, rochas e plantas. A espécie *Colobanthus quitensis* (kunth) Bartl representa a única dicotiledônea que colonizou o ecossistema Antártico e possui mecanismos para sobreviver em condições hostis, sendo um substrato propício a colonização de fungos. Este estudo teve como objetivo caracterizar morfológicamente e fisiologicamente o fungo isolado de amostras da rizosfera de *C. quitensis*. Para tanto, foram realizadas coletas durante Expedição Antártica Brasileira XXXI (2012-2013), de amostras de raízes de *C. quitensis* que cresciam nas áreas de degelo da Ilha Rei George, situada na Antártica Marítima. Inóculos de (9 mm de diâmetro), obtidos a partir de raízes de *C. quitensis* e preservados em meio Capelani, foram utilizados para a ativação do micélio, em meio de cultivo Batata-dextrose-ágar (BDA), pH 4 e mantidos na Câmara de Fotoperíodo à temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ , na ausência de luz. Para melhor visualização das estruturas reprodutivas e hifas do fungo isolado foi realizada a *culture slide*, utilizando 5 placas de Petri contendo meio BDA e mantidas na Câmara Fotoperíodo em temperatura  $10^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 30 dias na ausência de luz. A partir desta técnica, foi realizada a coloração de núcleo, sendo possível constatar que o isolado possui hifas septadas, e hifas mononucleadas. Como base nas análises morfológicas o fungo foi identificado pertencente ao gênero *Geomyces* Traaen. As análises filogenéticas e moleculares utilizando regiões ITS da subunidade 5.8s do rRNA demonstrou a identidade deste isolado como pertencente a classe *Eurotiomycetes* O.E. Erikss. & Winka e com as espécies de *Geomyces vinaceus* Dal Vesco e *Pseudogymnoascus roseus* Raillo. Diferentes temperaturas (5, 10, 15, 25 e  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), foram testadas para verificar a relação das diferentes temperaturas com a produção de biomassa do isolado. Comparando as médias dessas cinco temperaturas, obteve-se um resultado da pesagem a úmido e a seco desses micélios, após 33 dias de crescimento, onde o fungo não foi capaz de se desenvolver na temperatura de  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ , e demonstrou um melhor crescimento micelial na pesagem a úmido e a seco na temperatura de  $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sendo assim um fungo psicrófilo. Na determinação da patogenicidade onde o *Lolium multiflorum* Lam

foi tratado com extrato do fungo isolado em dois tratamentos 1.0ml e 2.0ml, o *L. multiflorum* apresentou um melhor crescimento aéreo e radicular no tratamento com 1.0ml, porem estatisticamente o fungo não demonstrou nenhum efeito na planta.

Palavras Chaves: Antártica. Fungos. Morfologia. Fisiologia.



## ABSTRACT

The biota of Antarctica, more than other continents, is dominated by microorganisms, such as fungi. The distribution of fungi in the Antarctic continent relates to substrates such as soils, rocks and plants. The species *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl is the only dicot that colonized the Antarctic ecosystem and has mechanisms to survive in harsh conditions, with a favorable substrate colonization of fungi. This study aimed to characterize morphologically and physiologically the fungus isolated from the rhizosphere samples of *C. quitensis*. To this end, samples were taken during the Brazilian Antarctic Expedition XXXI (2012-2013), samples of *C. quitensis* roots that grew in the fields of melting of King George Island, located in the Maritime Antarctic. Inoculant (9 mm diameter), obtained from *C. quitensis* roots and preserved among Capelani were used for the activation of the mycelium, the culture medium for potato dextrose agar (PDA) maintained at pH 4 and photoperiod chamber at a temperature of  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$  in the absence of light. For better visualization of the reproductive structures and hyphae of the fungus culture slide was performed using 5 Petri dishes containing PDA medium and maintained in Photoperiod camera on  $10^{\circ}\text{C} \pm 1$  temperature for 30 days in the dark. From this technique, staining nucleus was performed and established that the isolated has chambered hyphae, hyphae and mononuclear. As the basis of morphological analyzes the fungus was identified belonging to the genus *Geomyces* Traaen. Phylogenetic and molecular analysis using ITS regions of the subunit 5.8S rRNA demonstrated the identity of this isolated as belonging to class *Eurotiomycetes* OE Erikss. & Winka and species *Geomyces vinaceus* Dal Vesco and *Pseudogymnoascus roseus* Ralillo. Different temperatures (5, 10, 15, 25 and  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), were tested to verify the relationship of various temperatures with the production of isolated biomass. Comparing the average of these five temperatures, was obtained as a result of weighing the wet and dry mycelia those after 33 days of growth, where the fungus was not able to grow at a temperature of  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , and showed better growth mycelial weighing in wet and dry at a temperature of  $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , thus a psicrófilo fungus. In determining the pathogenicity where *Lolium multiflorum* Lam was treated with the isolated fungus extract in two treatments 1.0ml and 2.0ml, *L. multiflorum* showed a better growth in air treatment with 1.0ml, statistically however the fungus showed no effect on plant .

Key words: Antarctica. Fungi. Morphology. Physiology.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1- Detalhes da espécie <i>Colobanthus quitensis</i> (Kunth) Bartl. A esquerda detalhe da flor e próximo de rochas, a direita em meio a outras vegetações..... | 21 |
| Figura 2- Estação Polonesa Henryk Arctowski, local próximo da estação onde ocorreu a coleta.....   | 25 |
| Figura 3- Foto da colônia do fungo isolado.....  | 30 |
| Figura 4- Imagem das Hifas do fungo isolado.....   | 32 |
| Figura 5- Árvore filogenética do fungo isolado da porção radicular do <i>C. quitensis</i> .....  | 34 |
| Figura 6- Gráfico de comparação das médias do crescimento aéreo e radicular da gramínea <i>Lolium multiflorum</i> Lam., tratadas com extrato do fungo .....          | 36 |
| Figura 7- Foto dos três tratamentos com extrato do fungo em <i>Lolium multiflorum</i> Lam.....   | 37 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Demonstra o número de replicas de <i>L. multiflorum</i> para cada tratamento com extrato do fungo isolado..... | 25 |
| Tabela 2- Comparação das médias do peso seco e úmido nas cinco temperaturas.....   | 33 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....   | 17 |
| 2.1 Antártica.....   | 17 |
| 2.2 Fungos na Antártica.....   | 18 |
| 2.4 <i>Colobanthus quitensis</i> (KUNTH) BARTL.....                    | 20 |
| 2.4 <i>Geomyces</i> sp.....  | 22 |
| 3 OBJETIVO DO ESTUDO.....  | 24 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 25 |
| 4.1 Avaliação morfológica do Fungo Isolado.....                        | 25 |
| 4.1.1 Coleta do material para estudo.....                              | 25 |
| 4.1.2 Isolamento e Preservação do fungo.....                           | 25 |
| 4.1.3 Cultivo do Isolado e caracterização macroscópica da colônia..... | 26 |
| 4.1.4 Caracterização microscópica do isolado.....                      | 26 |
| 4.1.5 Avaliação do crescimento micelial.....                           | 27 |
| 4.2 Avaliação molecular do fungo isolado.....                          | 27 |
| 4.2.1 Extração de DNA, amplificação e purificação.....                 | 27 |
| 4.2.2 Identificação do fungo Isolado.....                              | 28 |
| 4.3 Avaliação dos efeitos patogênicos do fungo isolado.....            | 28 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 30 |
| 5.1 Avaliação Morfológica do isolado.....                              | 30 |
| 5.1.1 Características macroscópicas.....                               | 30 |
| 5.1.2 Características microscópicas.....                               | 31 |
| 5.1.3 Avaliação do crescimento micelial peso seco e úmido.....         | 32 |
| 5.2 Identificação molecular.....                                       | 34 |
| 5.2.1 Avaliação Filogenética.....                                      | 34 |
| 5.3 Avaliação da Patogenicidade .....                                  | 35 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 38 |
| REFERÊNCIAS.....   | 39 |

## 1 INTRODUÇÃO

A Antártica é isolada dos demais continentes, pela sua distância e por correntes marítimas. Apresenta um ambiente com grandes variações e escassez de nutrientes, possui ciclos de congelamento e degelo, que influencia a distribuição das massas de água no Oceano Austral, e geram alterações locais de clima. (WYN-WILLIAMS, 1996; VINCENT, 2000; CLARKE, 2003). Nestas condições, poucas plantas são capazes de sobreviver, entre elas se destacam as espécies *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) e *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) que representam as duas únicas angiospermas adaptadas às condições extremófilas da Antártica (PARNIKOZA et al., 2007), e além de sobreviver nesse ambiente, é um substrato de vários microorganismos, destacando os fungos (ROSA et al., 2010). Esses fungos são de diferentes táxons, e entre eles se destacam linhagens adaptados às condições extremas da Antártica, endêmicos e possíveis novas espécies. Esse grupo é de grande importância na biosfera por serem colonizadores primários de novos habitat e fornecedores de biomassa e energia e ainda por se apresentarem como patógeno ou simbioses de plantas e animais (HAWKSWORTH, 2004).

Inúmeros papéis biológicos essenciais têm sido associados aos microrganismos, porém o conhecimento das relações e evolução de muitos grupos taxonômicos microbianos ainda é escasso. Com relação aos fungos, apenas 105 mil espécies (7%) são conhecidas pela ciência dentro de uma estimativa de 1,5 a três milhões de espécies a serem descobertas (HAWKSWORTH, 2004). O estudo de microrganismos encontrados no ambiente Antártico, pode ser considerado uma grande fonte de novos estudos, pois pertencem a um ambiente ainda pouco explorado, e podem representar a descoberta de novos medicamento e compostos bioativos. Neste sentido os estudos de biodiversidade e bioprospecção da Antártica devem ser estimulados.

O avanço das técnicas moleculares tem permitido um grande salto na compreensão da filogenia, biodiversidade e evolução dos microrganismos em diversos ecossistemas e amostras ambientais, Entretanto, mesmo com a introdução dessas técnicas modernas, o conhecimento atual da diversidade microbiana na Antártica é vago (TINDALL, 2004).

As comunidades microbianas Antárticas são temas de grande importância por estarem sujeitas ao longo período de isolamento com baixos níveis de perturbação. Entretanto, as atividades humanas nas regiões Antárticas podem impactar de forma irreversível a compreensão dos ecossistemas microbianos. A partir do final dos anos 50, esses habitats ficaram sujeitos as maiores alterações devido às atividades humanas quanto às mudanças climáticas globais (CLARK, 2003): Pouco se sabe sobre os níveis de endemicidade dentro dos grupos microbianos da Antártica, bem como da presença ou adaptações dentro da população de espécies invasoras.

As regiões Árticas e Antárticas ao longo da última década foram bastante investigadas para presença de bactérias, Archaea e algas, mas raramente se investiga as comunidades fungicas e suas estruturas (ABYZOV, 1993; VISHNIAC, 1993; NIENOW; FRIEDMAN, 1993; BROADY, 1993; MA et al., 1999, PIKUTA et al., 2007)

Desta forma o presente trabalho buscou avaliar um fungo isolado da porção radicular do *C. quitenses*. E os resultados provenientes desse estudo podem trazer novos conhecimentos sobre fungos que estão associados a substratos na Antártica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antártica

A Antártica é o continente mais meridional do planeta, localizado quase inteiramente dentro do Círculo Polar Antártico. Possui uma superfície de 14 milhões de Km<sup>2</sup>, equivalente a 1,6 vezes a área do Brasil ou 10% das áreas emersas do globo. (BISCHOFF, 1996; FERREIRA, 2009). Possui um dos ambientes mais extremos da Terra. É um continente remoto e inóspito e o clima é o mais frio e seco conhecido no planeta. Os ventos ultrapassam a velocidade de 100 km/h e a temperatura anual varia de -15°C no verão a -80°C no inverno (CHILD; KELLY, 1990; FERREIRA; 2009).

O continente Antártico é caracterizado pelo isolamento geográfico e climático e a maior parte possui pouca ou nenhuma influência antrópica (RUISI et al., 2007; BRUNATI et al., 2009). As condições que prevalecem são de baixas temperaturas, ciclos de congelamento e degelo, alta incidência de radiação ultravioleta, baixa precipitação anual, fortes ventos e baixa disponibilidade de água fatores considerados limitantes para a vida animal e vegetal (ONOFRI et al., 2007; RUISI et al., 2007; SHIVAJI; PRASAD, 2009). Porém o clima não é uniforme em toda a região Antártica, pois na ilha Rei George o seu caráter insular e a sua posição geográfica confere um clima marítimo, úmido e frio (MCKNIGHT; HESS, 2000), e sofre por influencia de sucessivos sistemas ciclônicos que trazem massas de ar quente e úmido, responsáveis pelos fortes ventos, e pelos bons índices de precipitação, onde a temperatura média anual é de -2,8°C, com variações no período do verão de -1,3 a -2,7°C e no inverno de -15,5 a - 10°C (SETZER; HUNGRIA 1994; BITANJA, 1995; BRAUN et al, 2001; FERRON et al, 2004).

As condições mais amenas dessas ilhas oceânicas das quais se insere a ilha Rei George, em relação ao clima seco e extremamente frio da Antártica, proporcionam um ecossistema mais diversificado e dinâmico (INOUE, 1991; FRANCELINO, 2004). Sua flora é composta basicamente por vegetais, caracterizada pela presença de cianobactérias, algas verdes, fungos, líquens e musgos e Angiospermas (FRANCELINO, 2004).



## 2.2 Fungos na Antártica

Os fungos são organismos eucarióticos cujos núcleos são dispersos em um micélio contínuo ou septado. Sua nutrição é obtida por absorção. São saprofíticos, parasitas facultativos ou biotróficos. Crescem como célula única (leveduras) ou como colônias filamentosas multicelulares (fungos filamentosos). Encontra-se em abundância no solo, nos vegetais e nas águas e se reproduzem por meios de ciclos telemórfos e anamórfos (TRABULSI et al., 2008).

Constituem um grande grupo de microrganismos encontrados em todos os nichos ecológicos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Os habitats, substratos ocupados e as funções desenvolvidas são amplamente diversificados nos ecossistemas. Na Antártica os fungos em geral estão relacionados com a distribuição dos diferentes substratos, solos, rochas e em raízes de espécies de plantas vasculares nativas, como a *Deschampsia antarctica* Desv. e *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (USPON et al., 2009).

Além disso, seus mecanismos de adaptação e sobrevivência, constantemente expostos a condições extremas resultaram na seleção de organismos produtores de substâncias únicas com funções ecológicas diversas. A maioria dos fungos no continente Antártico possuem ciclos anamórfos, parece que esses fungos desistiram da reprodução sexual o que significa que os ciclos de vida podem ser concluídos em um tempo mais curto e sem altos custos metabólicos. Os fungos Ascomycotas, quando reproduzem sexuadamente, mostram uma forte redução dos ascósporos comparadas com espécies que vivem em condições mais permissíveis (DE HOOG et al. 2005). Vários mecanismos de adaptação ao frio foram relatados nos microrganismos Antárticos, como uma grande capacidade de desidratação, produção de enzimas anticongelantes, alta tolerância ao frio, tolerância ao congelamento (ROBINSON, 2001), bem como uma estratégia bem estabelecida pelos microrganismos, que é alteração da composição da bicamada lipídica (RUSSELL, 1990). As baixas temperaturas também induzem a desidratação e stress osmótico em fungos e isto pode resultar na síntese de diferentes solutos compatíveis com papéis de proteção e atividade enzimática (BROWN, 1978), os fungos antárticos mostram uma ampla competência enzimática o que aumenta as chances de sobrevivência nesse ambiente desfavorável (FENICE et al., 1997).

As temperaturas de crescimento ideal dos fungos Antárticos variam, de acordo com Van e Uden (1984) e Vishniac (1987), fungos com temperatura ótima de crescimento, de 15 °C ou inferior e um máximo de até 25°C, e ainda capazes de crescer a 0 °C ou abaixo são considerados psicrófilos, aqueles capazes de crescer a 5°C e se desenvolverem abaixo dessa temperatura, independente da temperatura ideal, são psicrotolerantes. A microbiota Antártica é composta principalmente por psicrotolerantes (KERRY, 1990; ZUCCONI et al, 1996; AZMI; SEPPELT, 1997).

O conhecimento sobre os fungos Antárticos é o resultado de mais de um século de investigações realizadas por isolamentos em culturas puras a partir de vários fungos de diferentes substratos (KAPPEN, 1993), entretanto a caracterização de fungos com algum tipo de associação não foi totalmente compreendida (HUANG et al., 2001). Em geral nem todos os fungos descritos são capaz de crescer ativamente sob as condições da Antártica, e os que se desenvolvem no continente podem estar presentes como invasores, adaptados as condições Antárticas, ou nativas. A maioria dos ambientes Antárticos recebem continuamente uma grande quantidades de microrganismos de fora da região, como indicado pela alta frequência de espécies aparentemente cosmopolitas na maioria dos habitat, sobretudo pela proximidade com a América do Sul (KAPPEN, 1993). Esta dispersão depende de vetores, tais como ventos, animais e atividade humana (ZUCCONI et al. 1996) e podendo afetar a ecologia a formação das comunidades de plantas (RODRIGUEZ et al., 2001), pois os fungos em geral constituem um grupo de organismos que apresentam grande importância ecológica e econômica. São os decompositores primários em todos os ecossistemas terrestres e possuem importantes associações simbióticas com plantas vasculares (micorrizas), sendo a grande maioria dos patógenos de plantas, oferecem sistemas genéticos para os biólogos moleculares e são cruciais para a biotecnologia industrial (LI et al., 2000).

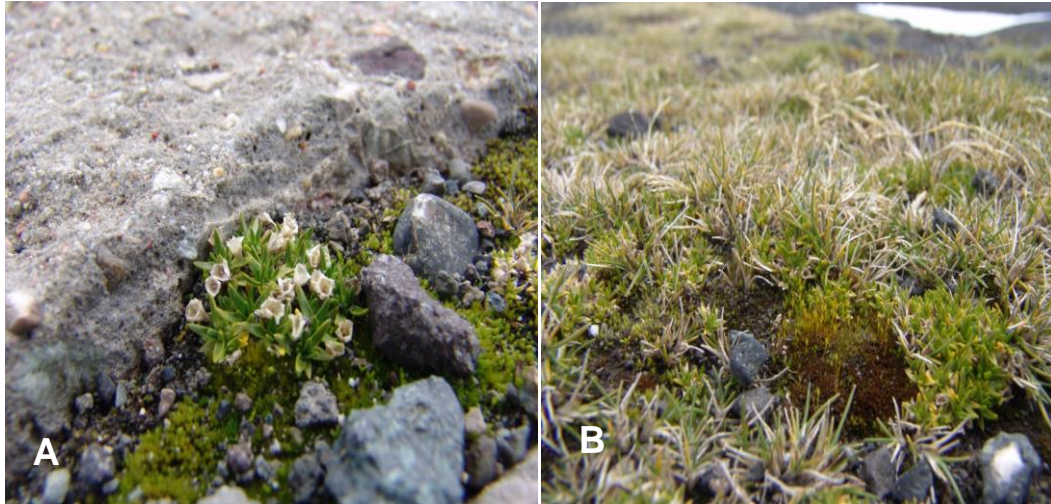
### 2.3 *Colobanthus quitensis* (KUNTH) BARTL

*Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., (Figura 1) é uma planta vascular nativa que vive na Antártica. É uma espécie comum dentro da Antártica Marítima (HOLTOM; GREENE, 1967; CORNER, 1971; GREENE; HOLTOM, 1971; LEWIS SMITH, 2003), onde as condições climáticas são mais favoráveis (ROSA et al, 2009; ROSA et al, 2010), ocorrendo assim uma rápida expansão desta planta na região (FOWBERT; LEWIS SMITH, 1994; LEWIS SMITH, 1994; GROBE et al., 1997; DAY et al., 1999; WALTHER et al., 2002; GERIGHAUSEN et al., 2003; ROBINSON et al., 2003). Na ilha Rei George que está situada dentro da Antártica marítima o *C. quitenses* cresce nas áreas baixas e alagadas e sobre encostas baixas e desnudas sem gelo, onde o calor da rocha favorece seu desenvolvimento (ZARZYCKI, 1993).

Essa espécie é capaz de sobreviver nessa região, pois possui uma capacidade de evitar formação de gelo nos seus tecidos e conservar 30% da sua taxa fotossintética a 0 °C. Além disso, possui um mecanismo de fotoinibição reversível a baixas temperaturas (EDWARDS; LEWIS-SMITH, 1988; XIONG et al., 1999; BRAVO et al., 2001).

Morfologicamente é uma planta de baixo porte (herbácea) com folhas lineares a lineares-triangulares. (MONTOVANI; VIEIRA, 2000). (Figura 1) e seu período de germinação na Antártica ocorre a partir de novembro (KIRK, 1994). São geralmente cobertas por neve a partir de abril, e não existem informações sobre a sobrevivência das folhas (LEWIS SMITH, 2003). Com isso disso a sobrevivência sob condições estressantes é baseado em sua anatomia e fisiologia (LEVITT, 1980) como arquitetura interna da folha associadas à baixa estatura, forma de crescimento denso, hábito e metabolismo fotossintético, essas características contribuem para o êxito da sobrevivência da angiosperma *C. quitenses* na Antártica (MONTOVANE; VIEIRA, 2000).

Figura 1 - Detalhes da espécie *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. A esquerda detalhe da flor e próxima das rochas (A), a esquerda em meio a outras vegetações(B).



Fonte: (A) e (B) Foto de Filipe de Carvalho Victória.

Além disso, o *C. quitensis* é um substrato de espécies de fungos saprofitos, patogênicos e possivelmente de novas espécies. Foram identificados vários gêneros associados à esta angiosperma *C. quitensis* como *Aspergillus* P. Micheli, *Cadophora* Lagerb. & Melin, *Davidiella* Crous & U. Brau, *Entrophospora* R.N. Ames & R.W. Schneid, *Fusarium* Link, *Geomyces* Traaen, *Gyoerffyyella* Kol, *Microdochium* Syd. & P. Syd, *Mycocentrospora* Deighton, e *Phaeosphaeria* I. Miyake, sendo as espécie mais comumente encontrada *Davidiella tassiana* (De Not.)Crous & U. Braun, *Cadophora luteo-olivacea* (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew e *Geomyces pannorum* Sigler & J.W. Carmich, em folhas de *C. quitensis* (ROSA et., 2010). Entretanto muitos estudos revelaram uma diversidade de comunidades de fungos associados a plantas que vivem em ecossistemas tropicais e temperadas, mas esses estudos parecem diminuir em regiões frias (HIGGINS et al.,2007). Com isso, esses fungos podem então servir de modelo para mais estudos ecológicos, evolutivos e sobre o seu comportamento nas condições de ambientes extremos.

## 2.4 *Geomyces* sp Traaen.

As espécies do gênero *Geomyces* Traaen. são comuns nos solos de ecossistemas de clima temperado e de alta latitude e são capazes de suportar e se desenvolverem em ambientes polares frios com baixa taxa de nutrientes (SIGLER; CARMICHAEL, 1976, CURRAH, 1985, SIGLER et al., 2000), pertence a família *Myxotrichaceae* Locq. ex Currah (Ascomycota) e compreende um proporção muito pequena da biota fúngica, com apenas cinco espécies conhecidas (KIRK et al, 2001; GARGAS et al., 2009). Entretanto, esses fungos têm uma distribuição mundial (KIRK et al., 2008), ocorrem em diversos ecossistemas e muitas vezes são mais comumente encontrados em regiões de ambiente frio, como em solos de plantações de trigo na Alemanha, solos da Antártica, no gelo permanente do Ártico e difundidos em ambientes marinhos, além disso tendem a ser queratinofílicos e psicrófilos, tolerantes ao sal e conhecidos por aproveitar a celulose como fonte de alimento (DOMSCH et al., 2007; OZERSKAYA et al. 2009 ; ARENZ et al., 2006).

A espécie do gênero *Geomyces* mais comumente identificada usando cultura e sequenciamento de DNA é o *Geomyces pannorum* Sigler & J.W. Carmich (KIRK et al. 2008). Esta espécie está associada a diversos substratos, como em escombros de uma mina de carvão em Alberta, Canadá e na floresta serapilheira (CHIEFFO 1983; CARREIRO; KOSKE 1992). *G. pannorum* é também uma das espécies de fungos comumente encontradas nas cavernas de Lascaux, na França, onde esta espécie é associada com os compostos de carbono disponível nos pigmentos usados nas pinturas de 15.000 anos (BASTIAN et al. 2009). Ozerskaya et al. (2009) revisaram os fungos associados com gelo permanente, e concluíram que espécies com potencial adaptativo significativo, como *Geomyces*, ocorrem com frequência.

Os membros desse gênero foram as espécies são frequentemente identificadas durante pesquisas de fungos do solo em diferentes locais na Antartica (MERCANTINI et al., 1989; ARENZ; BLANCHETTE, 2011). *G. pannorum* foi isolado de amostras de poeira no alojamento do acampamento base de uma expedição de pesquisa da Antártica (MERCANTINI et al., 1993). Espécies de *Geomyces* também sobrevivem em cryopegs no Ártico, que são massas de água que ocorrem em baixo ou dentro de grandes massas de gelo.

Os fungos do gênero *Geomyces* que vivem em ambientes polares, com uma baixa taxa de nutrientes, sobrevivem nos solos, em estado de dormência, crescem e se

reproduzem quando a nova matéria orgânica é introduzida no ecossistema (BERGERO et al., 1999), *G. pannorum* é capaz hidrolisar amido e de produzir lipase extracelular, xilanase, e urease, que permite que esta espécie consiga consumir e metabolizar diversas fontes de alimentos em ambientes frios com baixa taxa de nutrientes (FENICE et al., 1997) podendo também alterar os perfis de ácidos graxos e vias metabólicas em ambientes de baixas temperaturas (FINOTTI et al., 1993, 1996).

Os fungos desse gênero são conhecidos por ser facilmente dispersos pelo ar, água, penas de pássaros, pelos de animais, artrópodes e seres humanos e seus equipamentos. Na Antártica foi o táxon mais isolado a partir de uma variedade de matérias, incluindo pinguins, skuas, esterco, e penas (FRATE; CARETTA, 1990). Em outros estudos eles foram encontrados em locais com pouca ou nenhuma ave ou mamífero (AZMI; SEPPELT, 1998). O fungo *G. pannorum* foi também encontrado associados a materiais biológicos (MARSHALL, 1998) no solo e na pele de mamíferos escavadores, como musaranhos e ratazanas (SHCHIPANOV et al., 2003) e em nove ordens de artrópodes, sugerindo que o vôo destes pode ser importante meio de dispersão de espécies de *Geomyces* sp (GREIF; CURRAH, 2007).

Espécies *Pseudogymnoascus* Raillou, tipicamente e historicamente identificada sob o nome *Geomyces*, foram registradas com frequência na Antártica com distribuição em certo número de substratos, incluindo no solo de regiões frias, musgos, folhas de *C. quitensis*, talos de macroalgas e lagos de água doce (MERCANTINI; MARSELLA; CERVELLATI, 1989; TOSSI et al., 2002, ROSA et al., 2010; FRISVAD; SAMSON, 2004; JONES, 2011; GONÇALVES et al., 2012). O gênero *Geomyces* foi considerado por muito tempo sinônimo de *Chrysosporium* Corda., sendo atualmente reconhecido como distinto devido aos seus conidióforos, e possui uma relação sexuada com *Pseudogymnoascus*, Raillou (Myxotrichaceae). Morfológicamente, apresentam pequenos esporos ovais ou em forma de pera e hifas ramificadas que suportam os conidióforos (SIGLER; CARMICHAEL, 1976; SINGLER; LUMLEY; CURRAH, 2000; RICE; CURRAH, 2005). Conidióforos são estruturas de hifas especializadas em que os arthroconídios são formados e apoiados (LARONE, 2002). Espécies de *Geomyces* possuem conidióforos que tendem a ter uma coloração clara, translúcido, ou vítreo. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a ecologia e distribuição das espécies de *Geomyces* sp. (RICE; CURRAH 2005).

### 3 OBJETIVOS DO ESTUDO

Caracterizar e identificar o fungo isolado da raiz da angiosperma *Colobantos quitenses* (Kunth) Bartl.

Caracterizar morfológicamente e molecularmente o isolado.

Verificar em qual temperatura o isolado apresenta um melhor desenvolvimento.

Verificar, se o isolado é patógeno ou simbiote de plantas.

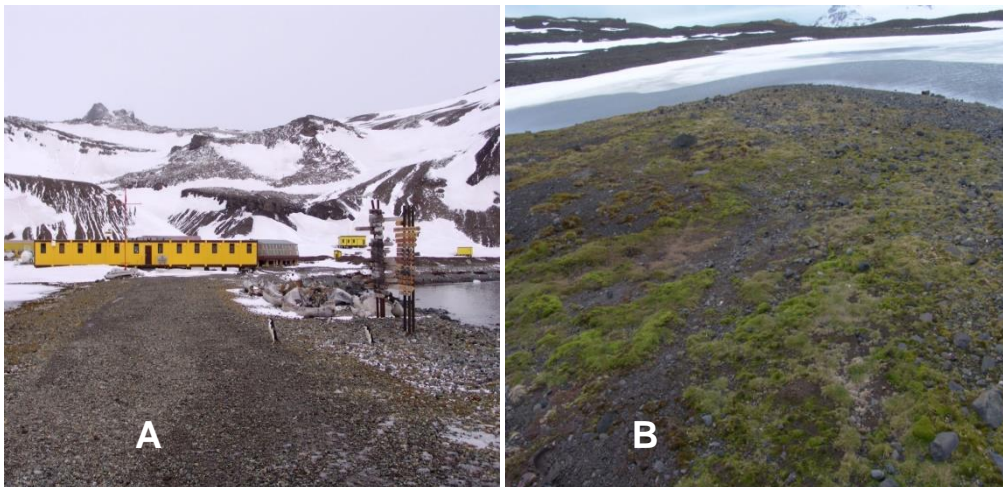
## 4 MATERIAS E METODOS

### 4.1 Avaliação morfológica do Fungo Isolado

#### 4.1.1 Coleta do material para estudo

Foram coletadas amostras de raízes de *Colobanthus quitensis* (KUNTH) BARTL durante o verão austral de 2012/2013 na OPERANTAR XXXI, por membros da equipe da Expedição Antártica do PROANTAR, que estudam as comunidades de criptógamos, adjacentes a Estação Polonesa Henryk Arctowski e da praia próxima a geleira Ecology.( Figura 2)

Figura 2- (A) Estação Polonesa Henryk Arctowski, (B) Local próximo da estação onde ocorreu a coleta.



Fonte: (A) Foto de Filipe de Carvalho Victória, (B) Foto Margeli Pereira de Albuquerque.

#### 4.1.2 Isolamento e Preservação do fungo

As análises do fungo foram realizadas no laboratório Núcleo de estudos da vegetação Antártica (NEVA), situado em São Gabriel-RS na Universidade Federal do Pampa, onde foi isolado o fungo da porção radicular do *C. quitensis* e inóculos de 9mm de diâmetro foram mantidos em meio Capelani.



#### 4.1.3 Cultivo do Isolado e caracterização macroscópica da colônia

Os micélios mantidos em meio Capelani foram reativados em cinco placas de Petri contendo o meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA) com pH 4, e mantidas na estufa de fotoperíodo (Quimis) à temperatura de  $25 \pm 1$  °C, na ausência de luz, por 60 dias. Após 60 dias de crescimento, foram analisadas as características macroscópicas do isolado como cor da colônia, micélio, cor do inverso e diâmetro da colônia.

#### 4.1.4 Caracterização microscópica do isolado

Para visualizar microscopicamente as estruturas do isolado foi realizada a técnica *culture slide* seguindo o protocolo descrito por (KERN; BLEVINS, 2003), onde foi preparado um meio de cultura BDA e conservado no freezer. Posteriormente foram autoclavadas 5 placas de Petri por 20 minutos, contendo 2 cotonetes em cada placa, 1 lâmina e 1 lamínula onde esses cotonetes serviram como plataforma para lâmina. Em uma capela de fluxo laminar (Filtex.Class II B2) essas placas foram abertas e sobre a lâmina, colocado um cubo de 1cm<sup>2</sup> de meio BDA. Este foi escolhido por intensificar a esporulação dos fungos. Fragmentos miceliais do fungo foram dispostos nas extremidades do cubo de meio de cultura BDA, uma lamínula colocada sobre esse cubo, e essas placas de Petri foram umedecidas com cerca de 5 ml de água destilada, vedadas e levadas para estufa de fotoperíodo (Quimis) em temperatura  $10^{\circ}\text{C} \pm 1$  na ausência de luz durante 30 dias. Para identificação ao nível do gênero da colônia do fungo filamentoso isolado, foram efetuadas observações microscópicas das suas estruturas morfológicas, como tamanho das hifas, septos, e estruturas reprodutivas como conidióforo e conídios.

Para visualizar os núcleos celulares outra técnica foi realizada, segundo (Adaptado de Herr, 1979), onde 2 lamínulas contendo micélio do fungo sofreram lavagens nas soluções de, HCL 3M por 15 minutos, três porções de álcool 95% por uma de ácido acético por 15 minutos, álcool 70% por 15 minutos e álcool 100% por 15 minutos e posteriormente foram coradas com o corante giemsa por 3 minutos. Após a lamínula foi lavada com água destilada corrente para retirada do excesso de corante e seca em temperatura ambiente. Após foram colocadas sobre uma lamina e observadas no microscópio óptico (Zeiss AXIO).

#### **4.1.5 Avaliação do crescimento micelial**

Testes de temperatura foram realizados para avaliar a melhor temperatura do crescimento micelial, onde 50 placas de Petri contendo meio BDA e o micélio do fungo de 9mm de diâmetro foram submetidos a temperaturas constantes de 5, 10, 15, 25 e 30°C. Foram utilizadas 10 réplicas para cada tratamento, em cada temperatura na ausência de luz. Após 33 dias de crescimento a massa micelial foi avaliada por peso seco e úmido, os micélios do fungo foram retirados das placas e colocados em um béquer contendo 500 ml de água. Posteriormente fervidos em micro-ondas por 10 minutos, para que não ficasse nenhum resquício do meio de cultivo BDA. Após pesados em uma balança (Exacta), então esses micélios foram submetidos à estufa por 24h á 50 °C, e pesados novamente. As médias desses cinco tratamentos foram comparadas para obter um resultado da pesagem a úmido e a seco desses micélios. E submetidos à análise de variância seguido o teste TUKEY ( $p < 0,005$ ) usando programa estatístico Statistix 8.0

#### **4.2 Avaliação molecular do fungo isolado**

##### **4.2.1 Extração de DNA, amplificação e purificação**

A extração do DNA, do material foi realizada com o kit de Norgen (Biotec Corp.) planta / fungos, de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação das regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS) foi realizada utilizando os primers S3126T (5'-ATA TTA TGC AGT TCA GCG GGT-3 '), S2234C (5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3'), FFITS4R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3 '), FFITS5F (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'); Esta foi realizada como se segue: 30 ciclos de 95 ° C durante 2min, 95°C durante 1min, 50°C durante 30s e 75°C durante 2min; e uma extensão final a 72°C durante 5 min. O DNA foi purificado a partir do produto do PCR utilizando o kit de purificação PROMEGA Wizard® (SV gel e PCR Clean-Up) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados por ABI - PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### **4.2.2 Identificação do fungo isolado**

Após o resultado do sequenciamento das regiões ITS, as sequências foram submetidas ao programa Sequence Alignment Editor (BioEdit), e logo após submetidos ao programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6.06). Onde as sequências foram alinhadas uma a uma com sequências das regiões ITS de fungos encontrados associados a plantas. As sequências desses fungos foram retiradas do banco de dados GenBank. As relações filogenéticas para demonstrar os parentes mais próximos, foram estimadas utilizando a versão 6.06 do programa MEGA.

#### **4.3 Avaliação dos efeitos patogênicos do fungo isolado**

Para avaliar os efeitos patogênicos do fungo isolado, foi preparado um extrato, onde primeiramente 20g do isolado contendo o meio de cultura foi colocado em um béquer contendo 80ml de água destilada onde o mesmo foi macerado e mantido por um período de 24 horas dentro da capela de Fluxo Laminar. Após o macerado foi filtrado em um papel filtro para retirada do excesso de partículas grandes, como meio de cultura e filtrado novamente utilizando uma bomba peristáltica com um filtro de 0,22 micrômetros (MILLIPORE).

A planta *Lolium multiflorum* Lam. foi utilizada para tratamento com o extrato e cultivada em substrato vermiculita por 37 dias. O tratamento com o extrato do fungo isolado começou após 24 dias de crescimento da planta. O extrato foi adicionado com uma pipeta pasteur, a planta era tratada a cada 48h (Tabela 1).

Tabela 1. Número de réplicas de *Lolium multiflorum* Lam para cada tratamento com extrato do fungo isolado.

| <b>Tratamento</b>           | <b>Número de réplicas</b> |
|-----------------------------|---------------------------|
| <b>Controle</b>             | 10                        |
| <b>Tratamento com 1.0ml</b> | 10                        |
| <b>Tratamento com 2.0ml</b> | 10                        |

Fonte: Autor, 2015.

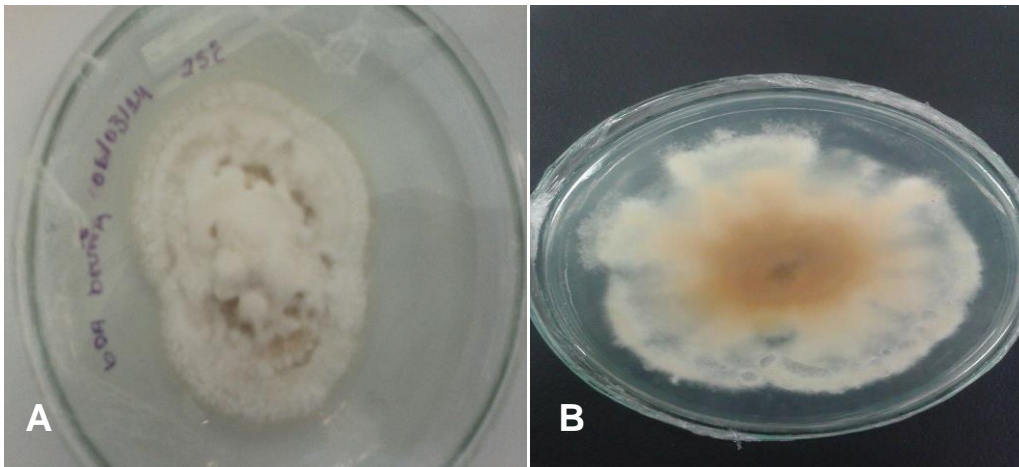
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação Morfológica do isolado

#### 5.1.1 Características macroscópicas

O fungo isolado, após 60 dias em uma temperatura de  $26^{\circ} \pm 1$  C, demonstrou uma textura algodonosa, produzindo micélio aéreo, topografia umbicada com elevações centrais em forma de mamilo, coloração branca predominante, com certas áreas de cor amarelo escuro (Figura 3, A), e na parte inferior a cultura apresentou uma coloração amarelo escuro no seu centro (figura 3, B).

Figura 3– Foto da colônia do fungo isolado: (A) Parte superior da colônia, (B) parte inferior.



Fonte: Autor, 2014.

Essas características relacionadas a textura e topografia foram descritas de acordo com (KERN; BLEVINS, 2003). Porém somente com essas características da colônia não é possível identificar espécie ou gênero de fungos, pois *in vitro* a mesma colônia pode frequentemente exibir cores e texturas deferentes. Entretanto apresentou características semelhantes com a espécie *Geomyces pannorum* Sigler & J.W. Carmich, isolada na Antártica em diversos substratos e recentemente reportado na literatura como *Pseudogymnoascus pannorum* MINNIS & D.L.

LINDNER (2013), que possui uma coloração de superfície entre branco e amarelo, apresentando do lado inverso da colônia um amarelo solúvel de pigmento cor castanha. Porém, segundo Pang e Mitchell (2005), estudos morfológicos que utilizam identificação baseada em características da taxonomia convencional podem apresentar dificuldades em serem realizadas devido as diferença de taxa de esporulação, presença de formas desconhecidas do ciclo de vida e limitações na distinção de espécies com morfologias semelhantes.

### **5.1.2 Características microscópicas**

Após 30 dias de crescimento em temperatura de  $10^{\circ}\text{C} \pm 1$  seguindo a técnica de *culture slides*, onde as lamínulas foram observadas em microscópio óptico na lente de 1000x. Para a identificação morfológica dos fungos filamentosos é necessário levar em conta características microscópicas (SAMSON et al. 2010). O fungo apresentou hifas hialinas com septos, parede grossa e o tamanho de um septo a outro foi em média 3 a 4  $\mu\text{m}$  (figura 4, A). Segundo Crous (2009) A presença de micélio septado e reprodução sexuada são características específicas de filos mais desenvolvidos, como Basidiomycota e Ascomycota. Porém o fungo não apresentou estruturas reprodutivas, ascos ou basídios, talvez pela temperatura ou meio inadequados, ou pelo fato de que fungos encontrados na Antártica geralmente não se reproduzem sexuadamente. Segundo De Hoog et al. (2005) a maioria dos fungos no continente Antártico possuem ciclos anamórficos.

Figura 4 – A imagem ilustra as hifas do fungo isolado: (A) hifas septadas, (B) núcleos das células.



Fonte: Autor, 2014.

(Barra A= 2 µm, B= 3 µm)

Segundo a técnica de coloração de núcleo foi possível observar que as células apresentaram um núcleo por segmento (Figura 4, B), podendo ainda não ter sofrido o processo de divisão celular.

### 5.1.3 Avaliação do crescimento micelial peso seco e úmido

Após 33 dias de crescimento, nas temperaturas 5, 10, 15, 25, 30 ± 1°C o fungo isolado demonstrou uma melhor produção da massa micelial nas temperaturas de 15± 1 °C no peso úmido e seco, obtendo uma menor produção nas temperaturas de 5± 1 °C no peso seco, quase nenhum a 30± 1 °C no peso seco e úmido (Tabela 2), demonstrando que o fungo é provavelmente um psicrófilo. Segundo van Uden (1984) e Vishniac (1987) fungos que se desenvolvem em uma temperatura ótima de 15°C e máxima de 25°C são chamados de psicrófilos. Além disso, espécies do gênero *Geomyces* segundo Domsch e colaboradores (2007) são psicrófilos, *G. pannorum* (= *P. pannorum*) possuem uma temperatura ótima de crescimento entre 18°C e 20°C e podem ser cultivadas a temperaturas tão baixas quanto 5°C cessando o crescimento a 30°C (TRAAEN, 1914), reforçando a hipótese de que morfologicamente o fungo isolado é do gênero *Geomyces*.

Tabela 2- Comparação das médias do peso seco e úmido nas cinco temperaturas.

| <b>Temperaturas de Crescimento</b> | <b>Média do Peso Úmido</b> | <b>Média do Peso Seco</b> |
|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>5°C ± 1</b>                     | 0,8809 B                   | 0,0418 C                  |
| <b>10°C ± 1</b>                    | 1,2638 B                   | 0,0997 B                  |
| <b>15°C ± 1</b>                    | 3,9047 A                   | 0,1533 A                  |
| <b>25°C ± 1</b>                    | 0,9650 B                   | 0,0931 B                  |
| <b>30°C ± 1</b>                    | 0,0486 C                   | 0,0064 D                  |

\* Os valores representados com a letra maiúscula igual na mesma coluna não diferem entre si, (A) demonstrou melhor crescimento e (C) e (D) não obtiveram crescimento significativo se comparados com (A), segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autor, 2014.



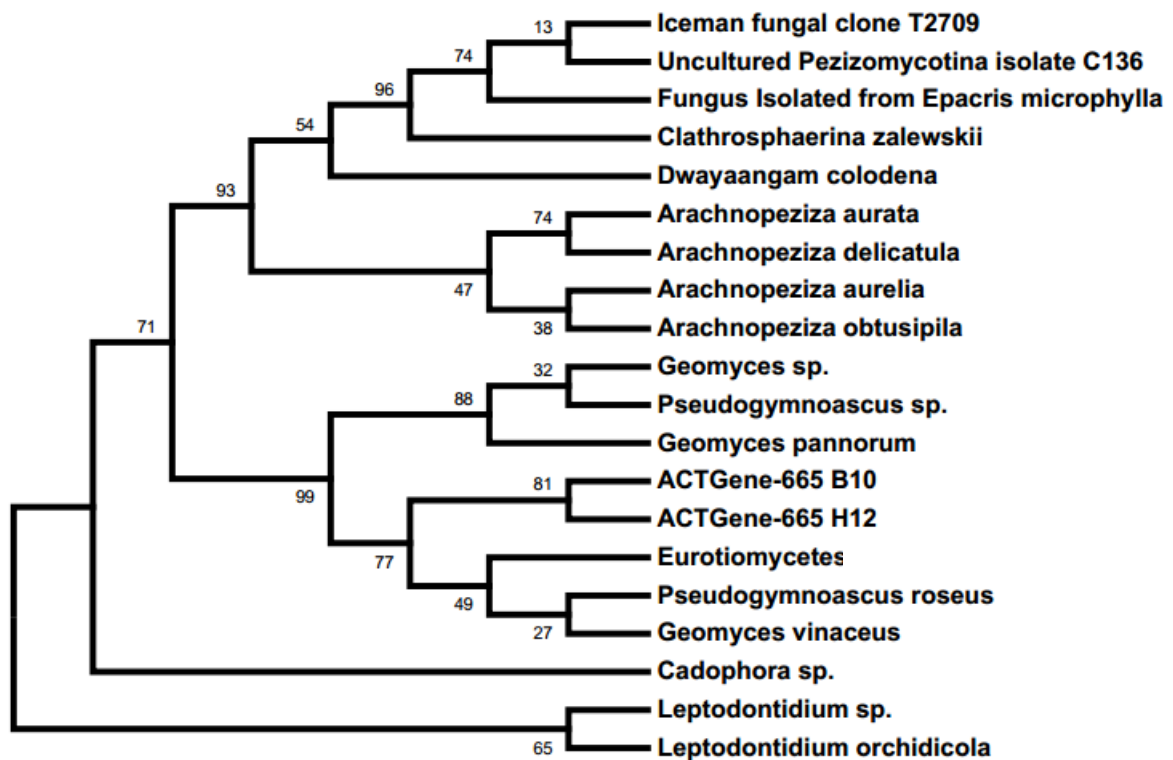
## 5.2 Identificação molecular

### 5.2.1 Avaliação Filogenética

A história evolutiva foi inferida utilizando o método do máximo risco baseado no modelo de dois parâmetros de Kimura. A árvore de consenso de bootstrap foi inferida a partir de 1000 repetições, para representar a história da evolução da taxa analisada. Ramos correspondente a partições reproduzidas em menos de 50% de réplicas de bootstrap são recolhidos (Figura 5).

A avaliação filogenética demonstrou que o fungo Isolado ACTGene-665 B10 e ACTGene-665 H12 possui similaridade com a classe dos *Eurotiomycetes* O.E. Erikss. & Winka, e com as espécies de *Geomyces vinaceus* Dal Vesco e *Pseudogymnoascus roseus* Raulo (Figura 5).

Figura 5- Árvore filogenética do fungo isolado da porção radicular do *C. quitensis*. A árvore foi construída com base nos genes das regiões ITS do ribossomo 5.8s, pelo método de máxima verossimilhança.

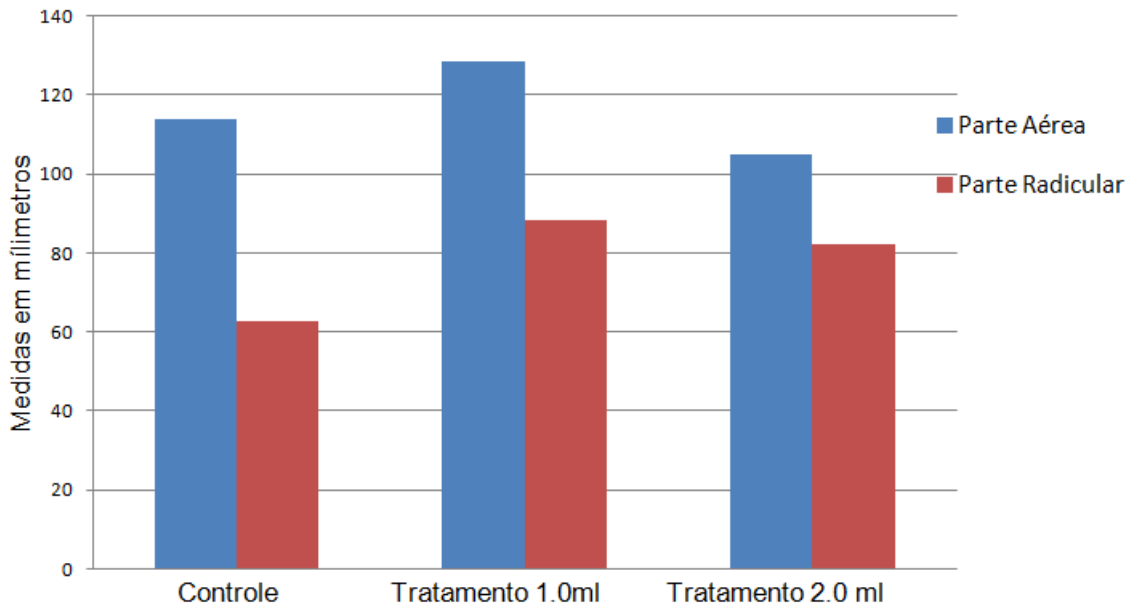


Fonte: Filipe de Carvalho Victória.

### 5.3 Avaliações da Patogenicidade

As análises do crescimento radicular e aéreo do *L. multiflorum* tratados com extrato do fungo, demonstraram um maior crescimento aéreo e radicular no tratamento com 1.0ml, porem não obteve nenhuma diferença estatística significativa (Figura 6). Dentre a classe e as espécies que demonstraram similaridade com o fungo isolado (Figura 5), todas possui uma relação com algum tipo de substrato. A classe dos *Eurotiomycetes*, é encontrada principalmente associada à líquens (Bates et al. 2012), A espécie *Geomyces vinaceus* e *Pseudogymnoascus roseus*, já foram isolado na Antártica em musgos, solos e raízes (TOSI et al., 2002; RICE; CURRAH 2006), mas a sua distribuição e relação com o seu substrato no ambiente Antártico permanece desconhecida (Arenz et al. 2011). Com isso as análises de patogenicidade do fungo isolado molecularmente similar às espécies *Geomyces vinaceus* e *Pseudogymnoascus roseus*, não demonstrou atividade patogênica na gramínea *Lolium multiflorum* Lam. (*Poaceae*) Essa planta serviu como modelo para esse estudo, pois essa gramínea é anual de inverno, da mesma família da angiosperma *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*), e de fácil manipulação no laboratório com crescimento inicial rápido.

Figura 6- Gráfico de comparação das médias do crescimento aéreo e radicular da gramínea *Lolium multiflorum*, tratadas com extrato do fungo isolado. A cor azul representa o crescimento aéreo da planta, em vermelho o crescimento radicular.

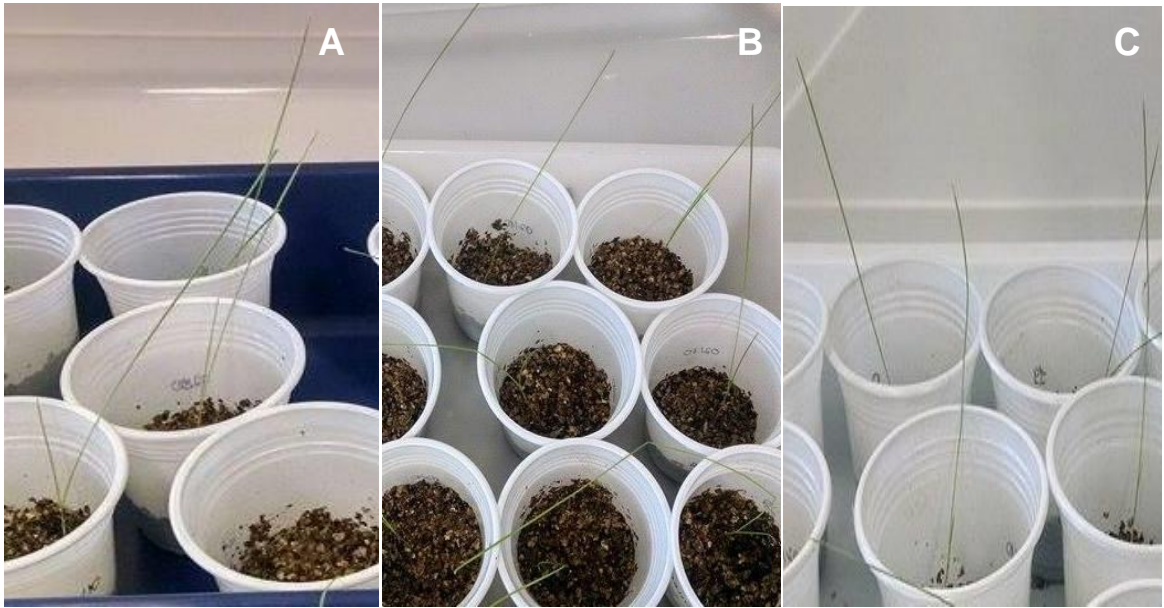


\* Os valores não diferem entre si ao nível de significância no Teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Fonte: Autor, 2015.

Entretanto na morfologia do *L. multiflorum* cultivado em vermiculita apresentou amarelecimento isso provavelmente não foi causado pelo fungo, mas sim pelo substrato não ser totalmente nutritivo, pois no controle ocorreu o mesmo amarelecimento, não havendo diferença morfológica entre o controle (Figura 7, A), em relação aos tratamentos (Figura 7, B e C). O *L. multiflorum* é uma gramínea considerada rústica, competitiva, com boa capacidade de perfilhamento e que se desenvolve bem em qualquer tipo de solo, mas prefere os argilosos, férteis e úmidos. Porém, em condições onde o solo apresente alta deficiência, tem seu desenvolvimento prejudicado (DE CONTO et al. 2011)

Figura 7- A foto dos três tratamentos com extrato do fungo em *L. multiflorum*. (A) Controle, (B) tratamento com 1ml (C) tratamento com 2ml.



Fonte: Autor, 2014.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que de acordo com as análises morfológicas o fungo apresentou características do gênero *Geomyces*, entretanto identificação de fungos somente pela morfologia apresenta dificuldades, pois os fungos podem modificar suas estruturas morfológicas dependendo das condições de cultivo, além disso a limitação na distinção de espécies com características semelhantes.

Nas análises do crescimento micelial nas temperaturas de 5, 10, 15, 25,  $30 \pm 1$  °C, o fungo apresentou uma melhor produção de massa micelial a  $15 \pm 1$  °C. Tal resultado pode indicar que o fungo isolado é um psicrófilo.

A partir da filogenia foi possível demonstrar as espécies e classe mais similares ao fungo isolado, classe *Eurotiomycetes* O.E. Erikss. & Winka, e com as espécies de *Geomyces vinaceus* Dal Vesco e *Pseudogymnoascus roseus* Riggio.

No teste de patogenicidade o fungo não apresentou nenhum efeito no *Lolium multiflorum* Lam, e o amarelecimento da planta, provavelmente foi desencadeado pela falta de nutrientes do substrato em que foi cultivado. Demonstrando assim que o fungo isolado possivelmente não possui atividade patogênica. Mais estudos devem ser realizados para entender melhor a associação desse fungo com *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.

## REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley ed. 4, p. 869, 1996

ARENZ, B.E.; HELD, B.W.; JURGENS, J.A.; BLANCHETTE, R.A. **Fungal colonization of exotic substrates in Antarctica**. *Fungal Diversity* 49: 13–22, 2011

ARENZ B.E; HELD B.W; JURGENS J.A; FARRELL R.L; BLANCHETTE R.A. **Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica**. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 3057–3064, 2006

AZMI, O.R.; SEPPELT R.D. **Fungi of the Windmill Islands, Continental Antarctica. Effect of temperature, pH and culture medium on the growth of selected microfungi**. *Polar Biol* 18:128–134, 1997

AZMI, O.R; SEPPELT R.D. **The broad-scale distribution of microfungi in the Windmill Islands region, continental Antarctica**. *Polar Biology* 19: 92–100, 1998

ABYZOV, S.S., **Microorganisms in the Antarctic ice**. In: Friedman, E.I. (Ed.), *Antarctic Microbiology*. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 265–285, 1993

BASTIAN, F; ALABOUVETTE, C; SAIZ-JIMENEZ, C. **The impacts of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave**. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1456–1462, 2009

BERGERO, R; GIRLANDA, M; VARESE, G.C; INTILI, D; LUPPI A.M. 1999. **Psychrooligotrophic fungi from Arctic soils of Franz Joseph Land**. *Polar Biology* 21: 361–368, 1999

BISCHOFF. V. **ANTÁRTICA**. Trabalho de pesquisa apresentado como requisito para a obtenção do diploma de aprovação do curso superior de Defesa Continental- Colégio Interamericano de Defesa. Washington D. C., 1996

BINTANJA R. **The local surface energy balance of the Ecology Glacier, King George Island, Antarctica: measurements and modelling**. *Antarctic Science*, 7:315- 325, 1995

BRUNATI, M ; ROJAS, J. L.; SPONGA, F ; CICILIATO, I. ; LOSI D.; GÖTTLICH, E. ; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI F. **Diversity and**

**pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes.** Marine Genomics, v. 2, p. 43-50, 2009.

BRAUN, M.; SAURER, H.; VOGT, S.; SIMÕES, J.C.; GOBMANN, H. **The influence of large-scale atmospheric circulation on surface energy balance on the ice cap of King George Island.** International Journal of Climatology, 21:21-36, 2001

BROWN, A.D. **Compatible solutes and extracellular water stress in eukaryotic microorganisms.** Adv Microb Physiol 17:181–242, 1978

BRAVO, L.A.; ULLOA NZÚÑIGA, G.E.; CASANOVA, A.; CORCUERA, L.J.; Alberdi M. **Cold resistance in Antarctic angiosperms.** Physiol Plant 111:55–65, 2001

BROADY, P.A. **Soils heated by volcanism.** In: Friedman, E.I. (Ed.), Antarctic Microbiology. Wiley-Liss, Inc., New York, p. 519, 1993

CLARKE, A. **Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic context.** In: HUISKES, A.H.L.; GIESKES, W.W.C.; ROZEMA, J.; SCHORNO, R.M.L.; VAN DER VIEIS, S. M.; WOLFF, W. J. (ed). Antarctic biology in a global context. Leiden: Backhuys Publishers. p. 3-17 , 2003

CHRISTENSEN, M. **A view of fungal ecology.** *Mycologia*. v.81, p.1-19, 1989

CHILD; JACK; KELLY; PHILIP. **Geopolítica, integración y conflicto en el Cono Sur y la Antártida,** p. 1-10, 1990.

CARREIRO, M.M.; KOSKE, R.E. **Effect of temperature on decomposition and development of microfungal communities in leaf litter microcosms.** Canadian Journal of Botany 70: 2177–2183, 1992

CORNER, R.W.M. **Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. And *Deschampsia antarctica* Desv. IV.** Distribution and reproductive performance in the Argentine islands. British Antarctic Survey Bulletin 26, 41\_50, 1971

CURRAH, R.S. **Taxonomy of the *Onygenales*: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*.** Mycotaxon 24: 1–216, 1985

CHIEFFO, D. **The influence of various environments and nutritional factors on the growth and survival of *Geomyces pannorum* in a reclaimed coal mine spoil.** Master's thesis. University of Calgary, Canada, 1983.

CROUS, P.W., VERKLEY, G.J.M., GROENEWALD, J.Z., SAMSON, R.A. **Fungal Biodiversity.** Vol. 1, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands, 2009

DE CONTO, L. ,SGANZERLA, D.C. , PEDROSO, C.E.S. E MONKS, P.L. **Relação azevém anual (*lolium multiflorum lam.*)- ruminante.** Arch. Zootec. 60 (R): 41-54, 2011

DE HOOG, G.S.; GOTTLICH, E.; PLATAS, G.; GENILLOUD, O.; LEOTTA, G.; VAN BRUMMELEN, J. **Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica.** Stud Mycol 51:33–76, 2005

DAY, T.A.; RUHLAND, C.T.; GROBE, C.W.; XIONG, F. **Growth and reproduction of Antarctic vascular plants in response to warming and UV radiation reductions in the field.** Oecologia, 119, 24\_35, 1999

DESHMUKH, S.K. **Incidence of dermatophytes and other keratinophilic fungi in the glacier bank soils of the Kashmir valley, India.** Mycologist 16: 165–167, 2002.

DOMSCH, K.H.; GAMS W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of Soil Fungi.** 2nd edn. IHW-Verlag, Eching, Germany 672, 2007

EDWARDS, J.A.; LEWIS-SMITH, R.I. **Photosynthesis and respiration of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* from the Maritime Antarctic.** Br Antarct Surv Bull 81:43–63, 1988

FRIEDMANN E.I. **Antarctic microbiology.** Wiley-Liss, New York, 634pp,1993

FERREIRA, F. **O sistema do Tratado da Antártica: evolução do regime e seu impacto na política externa brasileira,** 2009.

FERRON, F.A.; SIMÕES, J.C.; AQUINO, F. E.; SETZER, A.W. **Air temperature time series for King George Island, Antarctica.** Pesquisa Antártica Brasileira, 4:155 169, 2004



FRANCELINO, M. R. **Geoprocessamento aplicado ao monitoramento ambiental da antártica marítima: solos, geomorfologia e cobertura vegetal da península Keller**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado, 100 p, 2004

FENICE, M.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. **Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains**. *Polar Biology* 17: 275–280, 1997.

FINOTTI, E.; MORETTO, D.; MARSELLA, R.; MERCANTINI, R. **Temperature effects and fatty acid patterns in *Geomyces* species isolated from Antarctic soil**. *Polar Biology* 13: 127–130, 1993

FINOTTI, E.; PAOLINO, C.; LANCIA, B.; MERCHANTINI, R. **Metabolic differences between two Antarctic strains of *Geomyces pannorum***. *Current Microbiology* 32: 7–10, 1996

FRATE, G.; CARETTA, G. **Fungi isolated from Antarctic material**. *Polar Biology* 11: 1–7, 1990

FRIEDMANN, E.I. **Antarctic microbiology**. Wiley-Liss, New York, 634pp, 1993

FOWBERT, A.; LEWIS SMITH, R.I.L. **Rapid population increases in native vascular plants in the Argentine Islands, Antarctic Peninsula**. *Arctic and Alpine Research* 26, 290\_296, 1994

FENICE, M.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. **Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains**. *Polar Biol* 17:275–280, 1997

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. **Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins**. *Stud Mycol* 49:1–174, 2004

GREENE, D.M.; HOLTOM, A. **Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv. III. Distribution, habitats and performance in the Antarctic botanical zone**. *British Antarctic Survey Bulletin* 26, 1\_29, 1971

GROBE, C.W.; RUHLAND, C.T.; DAY, T.A. **A new population of *Colobanthus quitensis* near Arthur Harbor, Antarctica: correlating recruitment with warmer summer temperatures**. *Arctic and Alpine Research* 29, 217\_221, 1997

GREIF, M.D.; CURRAH, R.S. **Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung.** *Mycologia* 99: 7–19, 2007

GONÇALVES, V.N.; VAZ, A.B.M; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. **Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica.** *FEMS Microbiol Ecol* 82:459–471, 2012

GARGAS, A.; TREST, M.T.; CHRISTENSEN, M.; VOLK, T.J.; BLEHERT, D.S. ***Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome.** *Mycotaxon* 108: 147–154, 2009

GERIGHAUSEN U., BRAUTIGAM K., MUSTAFA O.,PETER H.U. **Expansion of vascular plants on an Antarctic islanda consequence of climate change.** In A.H.L. Huiskes et al. (eds.): *Antarctic biology in a global context*. Pp. 79\_83. Leiden: Backhuys Publishers, 2003

HOLTOM A.; GREENE S.W. **The growth and reproduction of Antarctic flowering plants.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 252, 323\_337, 1967

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. **Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 31, p.163-167, 2001.

HIGGINS K.L.; ARNOLD A.E.; MIADLIKOWSKA J., SARVATE SD, LUTZONI F. **Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages.** *Mol Phylogenet Evol* 42: 543–555, 2007

HAWKSWORTH, D.L. **Fungal diversity and its implications for genetic resource collections.** *Stud.Mycol.*, v. 50, p. 9-18, 2004

INOUE, M. **Ecological notes on the differences in flora and habitat of lichens between the Syowa station area in continental Antarctic and King George Island in maritime Antarctic.** *Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Biology*, 4:91-106, 1991

JONES EB. **Fifty years of marine mycology.** *Fungal Div* 50:73– 112, 2011

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**, Texto e Atlas. 2ª edição, 2003

KIRK J.T.O. **Light and photosynthesis in aquatic ecosystems**, 2nd edn. *Cambridge University Press*, London, p 545, 1994.

KERRY E. **Effects of temperature on growth rates of fungi from subantarctic Macquarie Island and Casey, Antarctica**. *Polar Biol* 10:293–299, 1990

KAPPEN L. **Lichens in the Antarctic region**. In: Friedmann EI (ed) *Antarctic microbiology*. Wiley- Liss, New York, pp 433–490, 1993

KIRK PM, CANNON PF, MINTER DW, STALPERS JA. **Dictionary of the Fungi**. CAB International, 2008

LARONE, D.H. **Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. 4th ed. American Society of Mycology Press, 2002

LI S., MARQUARDT R.R., ABRAMSON D. **Immunochemical detection of molds: a review**. *Journal of Food Protection Impact Factor* v.63:p.281-91, 2000

LEWIS SMITH R.I.L. **Vascular plants as bioindicators of regional warming in Antarctica**. *Oecologia* 99, 322\_328, 1994

LEWIS SMITH R.I.L. **The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica**. In A.H.L. Huiskes, et al. (eds.): *Antarctic biology in a global context*. Pp. 234\_239. Leiden: Backhuys Publishers, 2003

LEVITT J . **Responses of plants to environmental stresses**, vol II. Academic Press, London, 1980

LI, B.; CHANG, T.; LARSON, A. DING, J. **Identification of mRNAs expressed in tumor-infiltrating lymphocytes by a strategy for rapid and high throughput screening**. *Gene*, vol. 255, no. 2, p. 273-279, September, 2000

MERCANTINI R, MARSELLA R, CERVELLATI MC. **Keratinophilic fungi isolated from Antarctic soil**. *Mycopathologia* 106: 47–52, 1989

MERCANTINI R, MARSELLA R, MORETTO D, FINOTTI E. **Keratinophilic fungi in the Antarctic environment**. *Mycopathologia* 122: 169–175, 1993

MONTOVANE A, VIEIRA, R.C. **Leaf micromorphology of Antarctic pearlwort *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.** Polar Biol 23: 531-538, 2000

MARSHALL WA. **Aerial transport of keratinaceous substrate and distribution of the fungus *Geomyces pannorum* in Antarctic soils.** Microbial Ecology 36: 212–219, 1998

MA, L., CATRANIS, C.M., STARMER, W.T., ROGERS, S.O. **Revival and characterization of fungi from ancient polar ice.** Mycologist 13, 70–73, 1999

MERCANTINI R, MARSELLA R, CERVELLATI MC. **Keratinophilic fungi isolated from Antarctic soil.** Mycopathologia 106:47–52, 1989

MCKNIGHT, T.L.; HESS, D. **Climate Zones and Types: The Köppen System”, Physical Geography: A Landscape Appreciation.** Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall, 200 p, 2000

NIENOW, J.A., FRIEDMANN, E.I. **Terrestrial lithophytic (rock) communities.** In: Friedman, E.I. (Ed.), Antarctic Microbiology. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 350–358, 1993

NOBLES, M.K. **Identification of cultures of wood inhabiting Hymenomycetes.** Can. J. Bot. 43: 1097-1139, 1965

ONOFRI, S. A.; SELBMANN, L. A.; DE HOOG, G. S. B, GRUBE, M. C.; BARRECA, D. A.; RUISI, S. A.; ZUCCONI, L. **Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life.** Advances in Space Research, v. 40, p.1657-1664, 2007.

OZERSKAYA S, KOCHKINA G, IVANUSHKINA N, GILICHINSKY DA. **Fungi in permafrost. Pages 85–95 in Margesin R, ed. Permafrost Soils.** Soil Biology, vol. 16. Springer, 2009

PANG, K; MITCHELL J.I. **Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata.** Botanica Marina, Berlim, v.48, p. 332-347, 2005

PAPINI R.; MANCIANT F.; GRASSATTI G.; CARDINI G. **Survey of keratinophilic fungi isolated from city park soils of Pisa, Italy.** Mycopathologia, Netherlands, v.143, n. 1, p. 17- 23, 1998.

PARNIKOZA, I.Y.; MAIDANUK, D.N.; KOZERETSKA, I.A. **Are *Deschampsia Antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. Migratory Relicts?** Cytology and Genetics, v. 41, n. 4, p. 226–229, 2007.

PIKUTA, E.V. Microbial Extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews in microbiology*, v.33,p. 183-209, 2007

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. **Fungi in Antarctica**. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 6, p. 127-141, 2007.

RUSSELL, N.J. **Cold adaptation of microorganisms**. *Philos Trans Roy Soc London Ser B* 326:595–611,1990

ROSA LH, VAZ ABM, CALIGIORNE RB, CAMPOLINA S, ROSA CA. **Endophytic fungi associated with the Antarctic Grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)**. *Polar Biol* 32:161–167, 2009

RODRIGUEZ A, DOUGALL T, DODD JC & CLAPP JP .**The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora infrequens* comprise sequences related to two different glomelean families**. *New Phytol* 152: 159–167, 2001.

ROSA LH, VIEIRA MLA, SANTIAGO IF, ROSA CA. **Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica**. *FEMS Microbiol Ecol* 73:178–189, 2010

RICE AV, CURRAH RS. ***Oidiodendron*: A survey of the named species and related anamorphs of *Myxotrichum***. *Studies in Mycology* 53: 83–120, 2005

RICE A.V., CURRAH R.S.**Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora***. *Mycologia* 98:307–318, 2006

ROBINSON S.A., WASLEY J. & TOBIN A.K.. **Living on the edge\*plants and global change in continental and maritime Antarctica**. *Global Change Biology* 9, 1681\_1717, 2003

ROBINSON C.H. **Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi**. *New Phytol* 151:341–353, 2001

ROSA LH, VIEIRA MLA, SANTIAGO IF, ROSA CA. **Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica.** FEMS Microbiol Ecol 73:178–189, 2010

SIGLER L, CARMICHAEL JW. **Taxonomy of *Malbrachea* and some other hyphomycetes with anthroconidia.** Mycotaxon 4: 349–488, 1976

SIGLER L, LUMLEY TC, CURRAH RS. **New species and records of saprophytic ascomycetes (*Myxotrichaceae*) from decaying logs in the boreal forest.** Mycoscience 41: 495–502, 2000

SHCHIPANOV NA, ALEKSANDROV DY, ALEKSANDROVA AV. 2003. **Small mammals disperse micromycete spores.** Doklady Biological Sciences 390: 225–230, 2003

SHIVAJI, S. & PRASAD, G. S. **Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications.** Satyanarayana, T. & Kunze, G. (eds.) v, 2009, p. 3-18, 2009.

SETZER, A.W.; HUNGRIA, C.S. **Meteorologia na Península Antártica – alguns aspectos práticos.** São José dos Campos, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), 101 p, 1994

SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J.C., ANDERSEN, B. **Food and Indoor Fungi,** Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands, Vol. 2, CBS-KNAW, 2010

TRABULSI, L. R. Et al. **Microbiologia médica.** São Paulo: Atheneu. 5ª ed . p. 780. 2008

TRAAEN, A.E. **Untersuchungen über bodenpilze aus Norwegen.** Nytt Magasin for Naturvidenskapene 52: 1-121, 1914

TAKAHASHI, J.P.; PELEGRINI, A.; PEREIRA, C.Q.M.; SOUZA, M.C., **Levantamento de fungos queratinofílicos em solo de parques e praças públicas no município de São Bernardo do Campo.** Revista de Biologia e Ciências da Terra 1519-5228, 2011

TOSI, S.; CASADO, B., GERDOL, R., CARETTA, G. **Fungi isolated from antarctic mosses.** Polar Biol 25:262–268, 2002

TINDALL, B.J. Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. Microbial Ecolog, v. 47, p. 271-283, 2004

UPSON R, NEWSHAM KK, BRIDGE PD, PEARCE DA, READ DJ. **Taxonomic affinities of dark septate root endophytes of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*, the two native Antarctic vascular plant species.** Fungal Ecol 2:184–196, 2009

VICENT, W.F. **Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism.** Antarctic Science, v. 12, p. 374-385, 2000

VAN UDEN .N. **Temperature profiles of yeasts.** Adv Microb Physiol 25:195–251, 1984

VISHNIAC HS. **Psychrophily and systematics of yeastlike fungi.** In: de Hoog GS, Smith MTh, Weijman ACM (eds) The expanding realm of yeast-like fungi. Stud. Mycol. 30:389–402, 1987

VISHNIAC, H.S. **The microbiology of Antarctic soils.** In: Friedman, E.I. (Ed.), Antarctic Microbiology. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 304–309. 339, 1993

WALTHER G.R., POST E., CONVEY P., MENZEL A., PARMESAN C., BEEBEE T.J.C., FROMENTIN J.-M., HOEGH-GULDBERG O., BAIRLEIN F. **Ecological responses to recent climate change.** Nature 416, 389\_395, 2002

WYNN-WILLIAMS, D.D. **Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes.** Biodiversity and conservation, v. 5, p. 1271-1293, 1996

XIONG F.S., RUHLAND C.T., DAY T.A. **Photosynthetic temperature response of the Antarctic vascular plants *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*.** Physiol Plant 106:276– 286, 1999

ZARZYCKI, K. **Vascular plants and terrestrial biotopes.** In: S. RAKUSASUSZCZEWSKI (ed.), The maritime Antarctic Coastal ecosystem of Admiralty Bay, Polish Academy of Sciences, p. 181-187, 1993

ZUCCONI, L.; PAGANO, S.; FENICE, M.; SELBMANN, L.; TOSI, S.; ONOFRI, S. **Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica.** *Polar Biol* 16:53–61, 1996

ZUCCONI, L.; PAGANO, S.; FENICE, M.; SELBMANN, L.; TOSI, S.; ONOFRI, S. **Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica.** *Polar Biol* 16:53–61, 1996