

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE BROMÉLIA PRODUTORES DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

Ana Carolina Alves Santana¹

Alessandra Abrão Resende²

Vera Lúcia dos Santos³

Andréa Rodrigues Marques⁴

Agroecologia e Produção Agrícola Sustentável

RESUMO

Os microrganismos endofíticos, que vivem de forma simbiótica com os hospedeiros e habitam o interior das plantas, são capazes de estimular o desenvolvimento vegetal através da produção de hormônios vegetais, como o ácido indol-3-acético (AIA). O trabalho objetivou-se avaliar o potencial de produção de AIA de fungos filamentosos endofíticos isolados da bromélia *Vriesea minarum*. Os fungos foram isolados de plântulas desenvolvidas de sementes estéreis germinadas em Ágar-água em condição *in vitro*, e incubados em placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose. Para possível produção de AIA, os isolados foram cultivados em caldo Czapeksuplementado com Triptofano (1 g.L⁻¹) durante cinco dias. A detecção e a quantificação foram realizadas através da solução reagente de Salkoviski no sobrenadante do cultivo, um método colorimétrico que utiliza um leitor de microplacas Varioskan Flash ThermoScientific. Foram obtidos 32 micélios fúngicos e a capacidade de produção de AIA foi detectada em 26 dos isolados (81,25%). A partir dos resultados concluiu-se que os fungos isolados da espécie de *V. minarum* são bons produtores de AIA e podem ser de extrema importância como promotores de crescimento de planta. Estudos futuros com estes fungos poderão analisar o seu uso como biofertilizantes de outras espécies.

Palavras-chave: Bromélias; fungos endofíticos; Produção de AIA.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos vivem no interior das plantas sem causar aparentemente nenhum dano aos seus hospedeiros (AZEVEDO; MELO, 1998). De acordo com Chapla, Biasetto e Araújo (2012) essa associação sugere que estes microrganismos co-evoluíram com os seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualística, onde os endófitos recebem nutrientes e proteção, enquanto a planta tem vantagens decorrentes dessa interação. Os microrganismos endofíticos também são conhecidos como promotores de

¹Aluna de Graduação do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG) – Campus I, Departamento de Ciências e Tecnologia Ambiental (DCTA), anacarolinaasantana@yahoo.com.br.

²Bióloga do Jardim Botânico do Museu de História Natural da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), aleresende@mhnjb.ufmg.br.

³Profa. Dra. da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Microbiologia, verabio@gmail.com.

⁴Profa. Dra. do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG) – Campus I, Departamento de Ciências da Natureza (DCN), andreamg@gmail.com.

crescimento vegetal (MPCV), pois apresentam habilidade de produzir compostos capazes de estimular o desenvolvimento vegetal. Eles podem exercer diversas atividades benéficas e importantes no metabolismo e fisiologia da planta hospedeira, tais como fixação de nitrogênio atmosférico (AMBROSINI et al. 2007), solubilização de fosfatos (CHADHA; PRASAD; VARMA, 2015; SHI et al., 2016) sintetização de hormônios de crescimento de plantas (WAQAS et al., 2012; KHAN et al., 2016; KHAN et al., 2017) e antagonização de patógenos bacterianos (YUAN et al., 2017). Fungos endofíticos podem produzir hormônios vegetais, tal como o ácido indol-3-acético (AIA) (FU et al., 2015; OLIVEIRA, 2016).

Atualmente têm sido poucos os estudos sobre fungos filamentosos endofíticos associados à bromélia. Na literatura têm alguns relatos de fungos (micorrizas) associados a raízes (RABATIN; STINNER; PAOLETTI, 1993; LUGO; MOLINA; CRESPO, 2009; LUGO et al., 2015) e folhas (GIONGO et al., 2013) de bromélias. *AVrieseaminarum* é uma bromélia encontrada restritamente em afloramentos rochosos ferruginosos do Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais na Cadeia do Espinhaço (VERSIEUX, 2011). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de AIA por fungos endofíticos isolados das plântulas de *V. minarum* cultivadas *in vitro*.

METODOLOGIA

Para a germinação *in vitro*, foram coletadas dez infrutescências maduras e fechadas de *V. minarum* na Serra da Piedade. As sementes tiveram os seus apêndices removidos e foram submetidas à desinfecção superficial. A germinação foi realizada em placas de Petri com meio Ágar-água (0,8%) por 30 dias em câmara de germinação com intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura constante de 25°C.

Um lote de 16 plântulas desenvolvidas no procedimento anterior de cada planta de *V. minarum* foi posicionado na superfície de placas com meio Ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram cobertas com papel alumínio, evitando-se a presença da luz, e colocadas na incubadora a 25°C por quinze dias. Realizou-se monitoramento diário das culturas. Após os quinze dias, os fungos filamentosos que cresceram nas placas foram descritos e agrupados em morfotipos, cortados e isolados em meio Ágar Batata Dextrosado (BDA).

Para a quantificação do AIA, dois discos de micélio fúngico crescidos em meio BDA foram inoculados em frascos de vidro contendo 20 mL de caldo Czapek acrescido com 1g.L⁻¹ de L-triptofano e incubados sob agitação de 150 rpm na ausência de luz a 25°C. Após cinco

dias, retirou-se uma alíquota de 1 mL de caldo, que foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Em seguida, 100 µL de sobrenadante foram transferidos para microfocos de placa Elisa, onde foram adicionados 100 µL da solução reagente de Salkoviski (2% de solução FeCl₃ 0,5 M e 98% de solução de ácido perclórico a 35%). A placa foi mantida no escuro por 30 minutos e a temperatura ambiente. Posteriormente, a absorbância foi determinada a 530 nm em um leitor de microplacas Varioskan Flash (ThermoScientific). Utilizou-se como controle o meio de cultura sem inóculo. Uma curva-padrão de AIA foi construída com as leituras da absorbância das soluções aquosa de AIA comercial em concentrações de 0 a 100 de AIA µg.mL⁻¹. O ensaio foi realizado em triplicata. Foi aplicado o teste ANOVA, para detectar se a produção do metabólito foi significativa, os valores encontrados de P<0,001, significando que a produção de AIA foi de fato significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O AIA é produzido por microrganismos através de vias dependentes de L-triptofano ou independentes (KHAN et al. 2017). No estudo atual, foi analisada a produção de AIA pelos isolados fúngicos em meio com L-triptofano. Os resultados apontaram que dos 32 isolados testados, somente seis não produziram AIA (Tabela 1). Os valores variaram entre 0,62 e 131,94 µg/mL (Figura 1).

Tabela 1. Número de isolados de fungos endofíticos obtidos de plântulas da bromélia *Vriesea minarum*

| Características | Isolados de fungos endofíticos | |
|-----------------|--------------------------------|--------|
| AIA | Produz | 26 |
| | Não produz | 6 |
| | Total | 32 |
| | Produtivos | 81,25% |

No estudo realizado por Damasceno (2017), os valores de AIA produzidos pelos fungos filamentosos isolados de bromélia foram mais baixos e variaram entre 1,1 a 34,9 µg/mL; valores próximos a estes foram observados para fungos filamentosos isolados de plântulas de *Vriesea friburgensis* (SOUZA, 2017). Diversos estudos observaram valores de AIA dentro desta faixa de produção na dependência da L-triptofano (WAQAS et al., 2012; CHADHA; PRASAD; VARMA, 2015; SHI et al., 2016). No estudo de Nenwaniet al. (2010) também obtiveram produção aproximada de AIA (11,45 µg.mL⁻¹) e o valor foi considerado significativamente alto pelos autores. Na avaliação de 17 isolados de fungos endofíticos das

folhas de *Boswellia sacra*, KHAN et al. (2016) detectaram que apenas uma cepa produziu AIA independente de L-triptofano, já na dependência de L-triptofano, quase todas as cepas de fungos mostraram potencial para produzir AIA. A capacidade de produção de AIA foi detectada em 81,25% dos isolados, com valores considerados significativamente altos para 11 isolados (acima de 30 μ g/mL) (Figura 1).

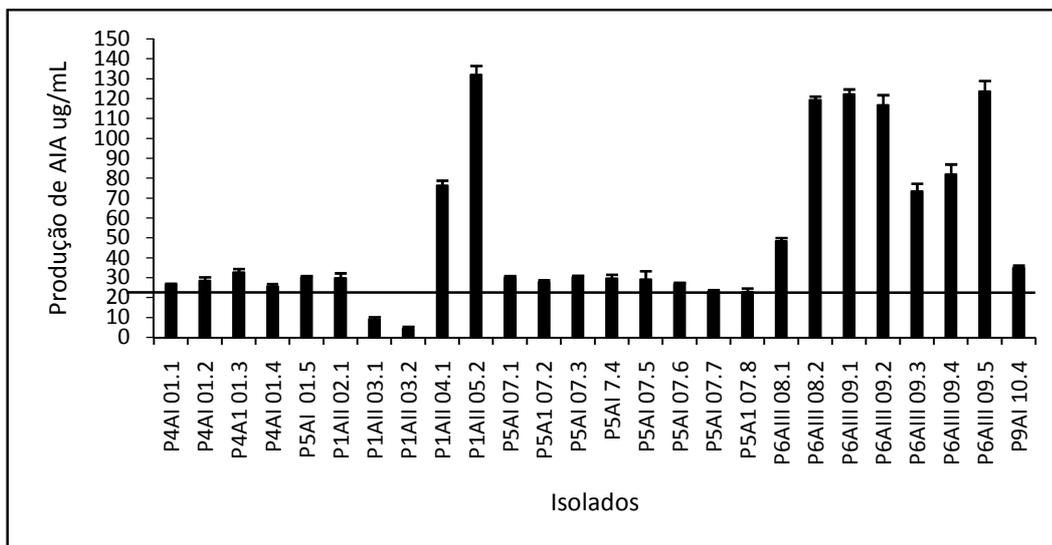


Figura 1. Produção de AIA μ g/mL por isolado fúngico obtidos a partir de plântulas da bromélia *Vriesea minarum*.

CONCLUSÕES

A alta produção de AIA pelos fungos endofíticos estudados pode ser usado como critério para selecionar potenciais bio-inoculantes. Neste caso, os fungos potenciais podem ter aplicações biotecnológicas no ramo da agronomia, produção de alimentos, e cultivo de bromélias diferentes espécies em viveiros. O uso de bio-inoculantes é mais sustentável, barato e menos ofensivo ao meio ambiente, quando comparado aos métodos tradicionais de manejo do solo. Estudos adicionais são necessários para compreender os benefícios desta interação. (Agradecimento à Fapemig pelo apoio financeiro)

REFERÊNCIAS

- AMBROSINI, A. et al. Bactérias promotoras de crescimento vegetal em *Vriesea gigantea* Gaudchi. (Bromeliaceae). Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v.5, p.1169-1170, 2007.
- AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. de. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. (eds) Ecologia Microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p.117-119. 1998.

- CHADHA, N.; PRASAD, R.; VARMA, A. Plant promoting activities of fungal endophytes associated with tomato roots from central Himalaya, India and their interaction with *Piriformosporaindica*. Int J. Pharm Bio Sci , India,v.6, p.333-343. 2015.
- CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Endophytic fungi: an explored and sustainable source of new and bioactive natural products. Revista Virtual de Química, São Paulo, v.5, n.3, p. 421-437.2012.
- DAMASCENO, M.A. *Fungos endofíticos de plântulas de Vriesea minarum L. B. Smith, uma espécie ameaçada de extinção e endêmica dos campos rupestres: potenciais produtores de fatores promotores de crescimento de plantas*. 2017. 37f.TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FU, S. F. et al. Indole- 3- acetic acid: a widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms.Plant Signaling & Behavior, Taiwan, v.10, p. 1-9.2015.
- GIONGO, A. et al. Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea* Gaud. and *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) L.B. Smith (Bromeliaceae). Biota Neotropica,v.13, p. 1-6.2013.
- KHAN, A.L. et al. Endophytic fungi from frankincense tree improves host growth and produces extracellular enzymes and indole acetic acid. Plos One, v.11, p.1-19.2016.
- KHAN, A.R. et al. Host plant growth promotion and cadmium detoxification in Solanum nigrum, mediated by endophytic fungi. Ecotoxicology and Environmental Safety,v.136, p.180-188.2017.
- LUGO, M.A.; MOLINA, M.G.; CRESPO, E.M. Arbuscularmycorrhizas and dark septate endophytes in bromeliads from South American arid environment.Symbiosis, Argentina, v.47, p.7-21.2009.
- LUGO, M.A.; REINHART, K.O.; MENOYO, E.; CRESPO, E.M.; URCELAY, C. Plant functional traits and phylogenetic relatedness explain variation in associations with root fungal endophytes in an extreme arid environment. Mycorrhiza, Argentina, v.25, p.85-95.2015.
- NENWANI, V.; DOSHI, P.; SAHA, T.; RAJKUMAR, S. Isolation and characterization of a fungal isolate for phosphate solubilization and plant growth promoting activity.Journal of Yeast and Fungal Research,India, v.1, p. 9-14. 2010.
- OLIVEIRA, T. Borges. *Leveduras produtoras de AIA e solubilização de P visando a promoção de crescimento de tomateiros*.2016. 42f. Monografia (Especialização) - Curso de Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, Universidade Federal de São Carlos, Araras.
- RABATIN, S.C., STINNER, B.R., PAOLETTI, M.G. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, particularly *Glomus tenuis*, in Venezuelan bromeliad epiphytes. Mycorrhiza, Wooster, v.4, p.17-20. 1993.
- SANTOS, M. A. *Fungos endofíticos isolados de sementes e plântulas cultivadas in vitro da espécie Vriesea friburgensis (Mez)*. 2017. 50f. Monografia (TCC) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SHI, Y. et al. Effects of Cd- and Pb-resistant endophytic fungi on growth and phytoextraction of *Brassica napus* in metal-contaminated soils.Environmental Science and Pollution Research, v.24, p. 417-426.2016.
- VERSIEUX, L. M. Brazilian plants urgently needing conservation: the case of *Vriesea minarum* (Bromeliaceae).Phytotaxa,Rio Grande do Norte, v.28, p.35-49.2011.
- YUAN, Y. et al. Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against *Verticillium wilt* disease. Plos One, China, v.12.2017.
- WAQAS, M. et al. Endophytic Fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. Molecules, v.17, p. 10754-10773.2012.