

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SEMENTES DE BROMÉLIA DE CAMPO RUPESTRE E POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE AUXINA IN VITRO

Mariana de Aguiar Santos¹

Alessandra Abrão Resende²

Ubiana de Cássia Silva³

Vera Lúcia dos Santos⁴

Recursos naturais

RESUMO

Microrganismos associados às plantas podem contribuir de diferentes formas para sua saúde e desenvolvimento. Em troca de abrigo e alimentação, os microrganismos produzem substâncias secundárias bioativas que podem auxiliar no combate a fitopatógenos e estimular o crescimento vegetal. Tal habilidade pode ser explorada como alternativa ao uso de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas. Já foram descritos microrganismos associados a diferentes partes do vegetal, raízes, folhas e sementes, no interior e superfície dos tecidos, contudo, estudos sobre a espermosfera ainda são escassos. Plantas de ambientes com alto grau de endemismo, como os campos rupestres, podem ser hospedeiras de uma diversidade microbiana ainda não conhecida, fontes novas de recursos naturais. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos isolar e identificar fungos associados a sementes de *Vriesea friburgensis* Mez, de campos rupestres da Serra da Piedade, Caeté, MG e caracterizá-los quanto o potencial de produção de ácido indol-3-acético (AIA), um fitohormônio. Um total de 20 fungos foi isolado a partir das sementes de *Vriesea*. Estes foram identificados por meio do sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, utilizando os iniciadores ITS1/ITS4, como pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Talaromyces* e *Diaphora*. Um total de 90% dos isolados analisados foi capaz de produzir AIA. Em trabalhos futuros, esses microrganismos serão avaliados quanto à possibilidade de utilização na produção de mudas de bromélias de interesse comercial e ambiental.

Palavras-chave: espermosfera, Bromeliaceae, Serra da Piedade, ácido indol-3-acético

INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos habitam os tecidos vegetais sem causar sintomas perceptíveis de doença ao hospedeiro (SMITH et al., 2008). Nesta interação, a planta fornece proteção e nutrientes, enquanto a microbiota produz metabólitos secundários bioativos, fitohormônios (entre eles, o AIA) e enzimas, contribuindo assim para o crescimento vegetal (SMITH et al., 2008; CHAPLA; BIASSETTO; ARAUJO, 2012; KHAN et al.

¹Mariana de Aguiar Santos, aluna do Curso de Ciências Biológicas (graduação em 2017), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, Laboratório de Microbiologia Aplicada, departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG. mariaguilar.bio@gmail.com

²Me. Alessandra Abrão Resende (bióloga), Museu de História Natural e Jardim Botânico da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. aleresende@mhnjb.ufmg.br

³Dra. Ubiana de Cássia Silva - Aluna do Programa de Pós Graduação em Microbiologia (pós-doutorado 2018), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, Laboratório de Microbiologia Aplicada, departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG. ubiana.microb.ufmg@gmail.com

⁴Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, Laboratório de Microbiologia Aplicada, departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG. verabio@gmail.com

2016). Estudos tem apontado estamicrobiota como uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas, tornando crescente o interesse de cientistas em seu estudo (TSAVKELOVA et al., 2006; FERREIRA et al., 2014; KHAN et al., 2016).

A *Vrieseafriburgensis* é uma bromélia encontrada nos campos rupestres do Quadrilátero Ferrífero (MG). Os campos rupestres são ecossistemas muito específicos, que apresentam elevada riqueza de espécies e grau de endemismo (SILVEIRA et al., 2016), e podem abrigar inúmeros recursos naturais ainda desconhecidos (FERREIRA et al, 2014). Nos últimos anos, a destruição desse ecossistema por atividades antrópicas, entre elas a mineração e extrativismo relacionado ao valor ornamental das plantas, tem comprometido a biodiversidade e todos os recursos naturais a ela associados, tornando urgentes pesquisas que contribuam para sua conservação e manejo (SILVEIRA et al., 2016).

Existem alguns poucos trabalhos sobre fungos endofíticos associados a raízes e plântulas de bromélias (LUGO et al., 2015; DAMASCENO, 2017), mas não há evidências na literatura de estudos de fungos associados a sementes destas plantas. Este trabalho teve como objetivos isolar e identificar fungos filamentosos associados às sementes de *Vrieseafriburgensis* e caracterizá-los quanto ao potencial de produção de AIA.

METODOLOGIA

Foram coletadas dez infrutescências maduras e fechadas de *V. friburgensis* na Serra da Piedade. As sementes foram submetidas à desinfecção superficial, sendo: 140 sementes de cada um dos indivíduos germinadas em placas de Petri com meio Ágar-água (0,8%) por 30 dias em câmara de germinação em intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura alternada de 25°C e 20°C; 20 sementes inteiras e 20 sementes seccionadas transversalmente de cada fruto depositadas em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrosado (BDA), acrescido de cloranfenicol a 100mg.L^{-1} , incubadas a 28°C por 30 dias (SANTOS, 2017).

As colônias de fungos obtidas foram caracterizadas quanto os aspectos macro morfológicos, purificadas em meio BDA e preservadas. Para identificação dos isolados, um representante de cada macro morfotipo foi selecionado para extração de DNA genômico total (NEUHAUSER; HUBER; KIRCHMAIR, 2009). A amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA foi realizada com o uso dos iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990; SCHOCH et al., 2012). O sequenciamento dos produtos de PCR previamente purificados foi realizado usando o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) em combinação com o sistema ABI 3730

DNA Analyser (AppliedBiosystems®), no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou, MG. As sequências foram analisadas utilizando o programa UNITE communityVersão 7.2) (<https://unite.ut.ee/analysis.php#>), para a comparação com as sequências depositadas no GenBank.

A avaliação do potencial de produção de ácido indol-3-acético foi realizada por meio de método quantitativo em meio líquido por ensaio fotométrico (GORDON; WEBER, 1951).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 20 isolados de fungos filamentosos a partir das sementes, classificados em 10 diferentes morfoespécies. Dados moleculares e filogenéticos foram utilizados para caracterizar taxonomicamente os isolados de fungos endofíticos, identificados como pertencentes a 4 gêneros, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe* e *Talaromyces*. Não foi possível chegar ao nível de espécie devido a necessidade do uso de outros marcadores moleculares, além do ITS(SCHOCH et al, 2012).

Entre os 20 isolados obtidos, 90% apresentaram potencial de produção de ácido indol-3-acético *in vitro*, com representantes de todos os gêneros. O potencial de produção variou de entre 17,5 e 33,4 µg de AIA.mL⁻¹. O isolamento de fungos endofíticos produtores de AIA tem tido destaque nas pesquisas pela importância do seu uso na área ambiental e agrônoma, como potenciais biofertilizantes (CHADHA; PRASA; VARMA, 2015).

Os gêneros aqui apresentados já foram descritos como isolados de ambientes naturais como rizosfera, filoplano, semente e fruto de plantas como caupi, cana-de-açúcar, *Velloziacompectae* e *V. gigantea* (RODRIGUES; MENEZES, 2002; STUART, 2006; SURYANARAYANAN et al., 2009; RODRIGUES, 2010; FERREIRA et al., 2017). O gênero *Fusarium* possui muitas espécies associadas a patologias de culturas de importância econômica (TUPAKI-SREEPURNA; KINDO, 2018). Apesar disso, alguns trabalhos tem registrado o isolamento de *Fusarium* não patogênicos, associados a plantas, com potencial para promoção de crescimento vegetal (STOLF, 2006; PAPURU et al., 2008; SILVA, 2015). O mesmo ocorre com *Colletotrichum*, para o qual algumas espécies já foram relatadas como mutualistas em uma gama de plantas hospedeiras de clima tropical, contribuindo para resistência sistêmica a patógenos, a promoção de crescimento vegetal e tolerância à seca (GUO; HYDE; LIEW, 2000; REDMAN et al., 2001). *Talaromyces* sp., como fungo endofítico, é comumente encontrado em frutas e, algumas espécies como *T. rugulosus*, já foram relatadas como produtoras de metabólitos secundários com bioatividade (MEDEIROS, 2014). Há

registros de amostras do gênero *Diaphorte* como patógeno, parasita e endófito (GOMES et al., 2013; FERREIRA et al., 2014).

A baixa riqueza microbiana observada neste trabalho pode se dar ao fato da baixa carga de endófitos presentes em sementes, associada à presença de compostos inibidores de crescimento (ROBINSON et al., 2016). A composição desta microbiota pode ser influenciada pelas diversas vias de transmissão, horizontais e verticais (SHADE et al., 2017), já tendo sido demonstrada a sua conservação ao longo da evolução da planta (JOHNSTON-MONJE; RAIZADA, 2011), o que evidencia a relevância de pesquisas nesta área.

CONCLUSÕES

No presente estudo foram isolados fungos endofíticos de sementes de *V. friburgensis* com potencial para produção de AIA, hormônio de crescimento vegetal. Em trabalhos futuros, esses microrganismos serão avaliados quanto à possibilidade de utilização na produção de mudas de bromélias de interesse comercial e ambiental, contribuindo para o manejo e conservação da família. (Agradecimentos ao apoio financeiro da Fapemig - PPM-00590-17).

REFERÊNCIAS

- 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.; BIASOTTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Endophytic fungi: an explored and sustainable source of new and bioactive natural products. Rev. Virt. Quim., S.P., 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 Eng. Ambiental e Sanitária, Centro Federal de Educação Tecnológica -MG, Belo Horizonte.
- FERREIRA, M.C. et al. Characterization of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with *Velloziagigantea*, an endemic Brazilian plant. Pl. Medica, v.80, p.773-774, 2014.
- FERREIRA, M.C. et al. Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Velloziagigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. Biochemical Systematics and Ecology, v.71, p. 163-169, 2017.
- GOMES, R.R. et al. *Diaphorte*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, v. 31, p.1-41. 2013.
- GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. Plant Physiol., v. 26, p.192-195, 1951.
- GUO, L.D.; HYDE, K.D.; LIEW, E.C.Y. Identification of endophytic fungi from *Livistonachinesia* based on morphology and rDNA sequences. New Phytologist, v.147, p.617-630, 2000.

- JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M.N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE*, v. 6, e20396, p. 1-22. 2011.
- 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.
- 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.
- MEDEIROS, L.S. *Prospecção química do metabolismo de fungos endofíticos isolados de maçã (Malus domestica) e goiaba (Psidium guajava)*. 2014. 252p. Tese (doutorado). Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- NEUHAUSER, S; HUBER, L.; KIRCHMAIR, M. A DNA based method to detect the grapevine root-rotting fungus *Roesleria subterranea* in soil and root samples. *Phytopathol Mediterr.*, v. 48, p. 59-72. 2009.
- PAPARU, P. et al. Greenhouse and field persistence of nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* in *Musa* tissue culture plants. *Microbial Ecology*, v. 55, p. 561-568, 2008.
- REDMAN, R.S. et al. Thermo tolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, v. 298, p.1581-1581, 2002.
- ROBINSON, R.J. et al. Wheat seed embryo excision enables the creation of axenic seedlings and Koch's postulates testing of putative bacterial endophytes. *Sc. Reports*, v.6, p. 1-9, 2016.
- RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru (PE). *Fitopat. Brasileira*, v.27, p. 532-537, 2002.
- RODRIGUES, R.L. *Fungos endofíticos associados à Vellozia compacta Mart. ExSchult. F. (Velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins*. 2010. 70p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- SCHOCH, C.L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 109, p. 6241-6246. 2012.
- SILVA, M.C.S. *Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de semente de guaranazeiro e o controle de antracnose (Colletotrichum spp.)*. 2015. 78p. Dissertação (Mestrado) - Centro de energia nuclear, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- SILVEIRA, F.A.O. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant Soil*, v.403, p.129-152, 2016.
- SHADE, A. et al. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, v. 37, p.15-22. 2017.
- SMITH, S. A. et al. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. *PLoS ONE*, v. 3 (8), p. 1-5, 2008.
- STOLF, E. C. *Efeito de re-inoculações de fungos endofíticos sobre o controle do nematóide cavernícola da bananeira (Radopholus similis)*. 2006. 50p. TCC (Graduação) – Curso de Engenharia Agrônoma - Universidade Federal de Santa Catarina, Turrialba.
- STUART, R.M. *Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada*. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado) – Univ. São Paulo, Piracicaba.
- SURYANARAYANAN, T.S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, v. 23, p. 9-19, 2009.
- TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, p. 117-126, 2006.

- TUPAKI-SREEPURNA, A; KINDO, A. *Fusarium*: The versatile pathogen. Indian Journal of Medical Microbiology, v. 36, p.8-17, 2018.
- WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, p. 315-322, 1990.