

Identificação de fungos endofíticos em miniestacas de acácia-negra

Izabela Moura Duin¹; Thiare Aparecida do Valle Coelho¹; Carolina Gracia Poitevin²; Álvaro Figueredo dos Santos^{3*}; Ida Chapaval Pimentel²; Celso Garcia Auer^{3*}

¹Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, CEP Curitiba, PR, Brasil. ²Programa de Pós-graduação em Microbiologia Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. ³Embrapa Florestas, CP 319, 83411-000, Colombo, PR, Brasil. *Bolsista CNPq.

Autor para correspondência: Celso Garcia Auer (celso.auer@embrapa.br).

Data de chegada: 29/05/2017. Aceito para publicação em: 02/10/2017.

10.1590/0100-5405/180656

RESUMO

Duin, I.M.; Coelho, T.A.V.; Poitevin, C.G.; Santos, A.F. dos; Pimentel, I.C.; Auer, C.G. Identificação de fungos endofíticos em miniestacas de acácia-negra. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.3, p.278-280, 2018.

Fungos endofíticos podem ter várias relações com mudas de plantas, desde a patogênese até a proteção e estímulo ao crescimento. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar fungos endofíticos

em miniestacas de acácia-negra. Miniestacas assintomáticas foram avaliadas e seis espécies de fungos endofíticos foram isoladas e identificadas.

Palavras-chave: Identification of endophytic fungi in black wattle minicuttings

ABSTRACT

Duin, I.M.; Coelho, T.A.V.; Poitevin, C.G.; Santos, A.F. dos; Pimentel, I.C.; Auer, C.G. Identification of endophytic fungi in black wattle minicuttings. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.3, p.278-280, 2018.

Endophytic fungi can have several relationships with seedlings, from pathogenesis to protection and growth stimulus. The aim of the present study was to identify endophytic fungi in

minicuttings of black wattle. Asymptomatic minicuttings were evaluated and six species of endophytic fungi were isolated and identified.

Keywords: *Acacia mearnsii*, vegetative propagation, nursery.

Todos os microrganismos que habitam o interior de um vegetal, ao menos em um período do seu ciclo de vida, podem ser considerados endofíticos ocupando os espaços intercelulares dos tecidos vegetais, como folhas e caules, sem causar danos aparentes (8).

Os microrganismos endofíticos penetram nas plantas basicamente através de aberturas naturais ou ferimentos, sendo que a principal porta de entrada é o sistema radicular (8). Os endofíticos frequentemente induzem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros, o que pode afetar a performance das plantas sob diferentes estresses bióticos ou abióticos, tais como déficit hídrico, salinidade e altas concentrações de metais no solo, herbicidas e herbívoros (5). Estes microrganismos podem ser benéficos aos hospedeiros ao conferir resistência a insetos e herbívoros, tolerância à dessecação, proteção contra patógenos e estimular o crescimento (8).

Por essas considerações, um levantamento exploratório de fungos endofíticos em miniestacas de acácia-negra foi desenvolvido para conhecer sua diversidade e as possíveis interações na miniestaquia desta espécie florestal.

A coleta de miniestacas assintomáticas de acácia-negra foi realizada em setembro/2015, em minijardim clonal localizado em viveiro comercial de Triunfo/RS. Cinquenta miniestacas assintomáticas foram coletadas ao acaso na casa de vegetação, embaladas em sacos plásticos limpos, identificadas e levadas ao Laboratório de Patologia Florestal

da Embrapa Florestas, Colombo/PR.

Utilizou-se a técnica de isolamento em meio de cultura descrita por Araújo et al. (1), que consta da lavagem das amostras em água corrente, imersão em solução de álcool 70% por 1 min, imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 3 a 4 min, imersão em solução de álcool 70% por 30 s e enxágue por duas vezes em água ultrapurificada estéril. As amostras foram fragmentadas com o auxílio de bisturi e os fragmentos, de aproximadamente cinco mm de comprimento, foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas em câmara B.O.D a 24 ± 2 °C, com ausência total de luz, por sete dias. Para a purificação das culturas, foi realizada repicagem para novas placas com meio BDA.

Estruturas reprodutivas foram retiradas de culturas puras e montadas em lâminas coradas com líquido de Amann e por meio da observação microscópica das lâminas foi realizada a identificação dos fungos, ao nível de gênero (2). Para a confirmação das espécies, foi realizado o sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal (10) e posterior comparação com sequências depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information website). O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LABMICRO) da UFPR. As culturas obtidas foram preservadas em tubos inclinados com meio BDA recobertas com óleo mineral e em vidros de penicilina contendo água ultrapurificada estéril

Tabela 1. Fungos endofíticos identificados em miniestacas assintomáticas de acácia-negra. Setembro/2015, Triunfo/RS.

Isolado	Fungo	Acesso GenBank	Identidade (%)
E1	<i>Papiliotrema fuscus</i> J.P. Samp., J. Inácio, Fonseca & Fell	KY962979	98
E2	<i>Papiliotrema fuscus</i> J.P. Samp., J. Inácio, Fonseca & Fell	KY962980	99
E3	<i>Colletotrichum</i> sp.	KY962997	100
E4	<i>Colletotrichum</i> sp.	KY962998	100
E5	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> Penz.	KY962993	100
E6	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> Penz.	KY962994	100
E7	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> Penz.	KY962995	100
E8	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> Penz.	KY962996	100
E9	<i>Diaporthe</i> sp.	KY962982	99
E10	<i>Diaporthe</i> sp.	KY962983	99
E11	<i>Diaporthe</i> sp.	KY962984	99
E12	<i>Diaporthe</i> sp.	KY962986	99
E13	<i>Diaporthe</i> sp.	KY962987	99
E14	<i>Diaporthe</i> sp.	KY962988	99
E15	<i>Diaporthe inconspicua</i> R.R. Gomes, C. Glienke & Crous	KY962985	99
E16	<i>Eutypella scoparia</i> Schwein.	KY962999	97
E17	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i> (G.F. Atk.) Maharachch., K.D. Hyde & Crous	KY962989	100
E18	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i> (G.F. Atk.) Maharachch., K.D. Hyde & Crous	KY962990	100
E19	<i>Phoma</i> sp.	KY962991	99
E20	<i>Phoma</i> sp.	KY962992	99
E21	<i>Sporobolomyces carnicolor</i> Yamasaki & H. Fujii ex Bai & Boekhout	KY962981	100

e lacrado com selo de alumínio (método de Castellani). Os isolados encontram-se depositados na Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas, Colombo/PR.

Vinte e nove fungos endofíticos foram obtidos de miniestacas assintomáticas de acácia-negra: *Colletotrichum* sp. (7%), *Colletotrichum gloesporioides* (14%), *Diaporthe* sp. (21%), *Diaporthe inconspicua* (3%), *Eutypella scoparia* (3%), *Sporobolomyces carnicolor* (3%), *Neopestalotiopsis clavispora* (7%), *Papiliotrema fuscus* (7%), *Phoma* sp. (7%) e não identificados (28%). Os fungos identificados e respectivas sequências depositadas no GenBank encontram-se na Tabela 1. Fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Neopestalotiopsis* e *Phoma* podem causar doenças em mudas florestais como eucalipto e erva-mate.

Acerca de fungos endofíticos em miniestacas e mudas acácia-negra, não existem trabalhos publicados. *D. inconspicua* foi relatado como endofítico em pecíolos de espinheira-santa (4) e *Colletotrichum* sp. em folhas de mudas de graviola (7). Do gênero *Pestalotiopsis*, próximo a *N. clavispora*, Bettucci e Saravay (3) encontraram *Pestalotiopsis guelpini* (Desm.) Stey. em folhas e hastes de mudas de *Eucalyptus globulus* Labill. e *Pestalotiopsis* sp. em segmentos de hastes de mudas seminais de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage (9).

Aspectos como abundância, diversidade e composição de espécies endofíticas podem ser influenciadas por fatores ambientais, como por exemplo a localização geográfica da espécie florestal (6). Como a coleta foi feita em um minijardim clonal, houve pouca variação geográfica que pudesse expressar toda a diversidade de fungos endofíticos presentes em mudas de acácia-negra. Além disso, as coletas foram efetuadas em

local onde a maioria das minicepas apresentam pouca ou nenhuma variabilidade genética, fator que também pode restringir o número de espécies fúngicas associadas. Para se ampliar o conhecimento de fungos endofíticos em plantas jovens de acácia-negra, seria recomendado analisar mudas seminais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à TANAC S.A. pelo apoio financeiro e técnico, à CAPES pela bolsa do primeiro autor, ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da UFPR e Embrapa Florestas pelo apoio estrutural e técnico.

REFERÊNCIAS

1. Araújo, W.L.; Lacava, P.T.; Marcon, J.; Lima, A.O.S.; Sobral, J.K.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Azevedo, J.L. **Guia prático**: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Cooperativa Luiz de Queiroz, 2010. 167p.
2. Barnett, H.L.; Hunter, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3rd ed. New York: MacMillan, 1972. 241p.
3. Bettucci, L.; Saravay, M. Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, p.679-682, 1993.
4. Gomes, R.R.; Glienke, C.; Videira, S.I.R.; Lombard, L.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, Leiden, v.31, p.1-41, 2013.
5. Gundel, P.E.; Martínez-Ghersal, M.A.; Batista, W.B.; Ghersa, C.M. Dynamics of *Neotyphodium* endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non-infected seed.

- Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.156, n.2, p.199-209, 2010.
6. Hoffman, M.T.; Arnold, A.E. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.112, p.331- 344, 2008.
 7. Oliveira Silva, R.L.; Luz, J.S.; Silveira, E.B.; Cavalcante, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasileira**, Brasília, DF, v.20, p.649-655, 2006.
 8. Neto, P.A.S.P.; Azevedo, J.L.; Caetano, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v.3, p.69-72, 2004.
 9. Sbravatti Junior, J.A.; Auer, C.G.; Pimentel, I.C.; Santos, A.F.; Schultz, B. Seleção in vitro de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, Curitiba, v.43, n.1, p.145-152, jan./mar. 2013.
 10. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. London: Academic Press, 1990. p.315-322.