



DESVENDANDO ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS EM ORQUÍDEAS BRASILEIRAS

Palavras-Chave: Rhizoctonia, *Tulasnella*, *Zygopetalum*

Autores/as:

SARA CRISTINE CANA VERDE SOUZA [E.E. FELIPE CANTÚSIO]
BRENDA SILVA RODRIGUES [E. E ADONIRAN BARBOSA]
ALEXSANDRA OLIVEIRA ALMEIDA [E.E. RESIDENCIAL SÃO JOSÉ]
Prof.^a Dr.^a SAMANTHA KOEHLER (orientador/a) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

Micorrizas são associações entre fungos e raízes de plantas. Essa é uma relação mutualística na qual ambos os organismos são beneficiados. As micorrizas podem ser classificadas em endomicorrizas ou ectomicorrizas, sendo as endomicorrizas definidas pela penetração de hifas dentro das células da planta e as ectomicorrizas pela não penetração de hifas nas células (Boldrini et al., 2010).

As plantas se beneficiam da eficaz extração de nutrientes vindos do solo por parte dos fungos micorrízicos (Boldrini et al., 2010). Estudos prévios demonstraram que as micorrizas podem aumentar a produtividade de plantas em solos com baixa fertilidade e reduzir a necessidade do uso de fertilizantes e venenos (Moraes, 2021). Além disso, micorrizas tornam as plantas mais resistentes à seca e podem auxiliar na restauração de ecossistemas degradados pela penetração de hifas dentro das células da planta (Toda Matéria, 2021). Em contrapartida, os fungos têm acesso aos aminoácidos e açúcares produzidos pela planta. Estima-se que 90% das plantas vasculares apresentam associações micorrízicas (Moraes, 2021).

Todas as orquídeas dependem de fungos micorrízicos para germinação e estabelecimento das plântulas. Micorrizas orquidóides são caracterizadas pela presença de fungos endomicorrízicos do grupo Rhizoctonia (Basidiomicetos). Esses fungos caracterizam-se pela formação do “peloton”, que é um emaranhado de hifas que se forma no interior das células das raízes. Além disso, as hifas do grupo Rhizoctonia caracterizam-se por apresentar ramificações em ângulo reto e pela formação de escleródios, que são estruturas de sobrevivência do fungo (Boldrini et al., 2010).

Micorrizas orquidóides são muito importantes para a conservação de orquídeas. Quando plântulas de orquídeas são desenvolvidas em laboratório com fungos micorrízicos, sua sobrevivência é maior. No entanto, o conhecimento sobre as espécies de fungos micorrízicos de orquídeas brasileiras é muito escasso. Por isso, propomos identificar espécies de fungos

micorrízicos em orquídeas brasileiras (Reiter et al., 2020). Nosso objetivo foi aprender sobre o processo de isolamento e identificação de fungos micorrízicos orquidóides nas orquídeas *Zygopetalum mackayi* Hook. (Figura 1) e *Z. mosenianum* Barb. Rodr. (Figura 2).

METODOLOGIA:

Por causa da necessidade de isolamento social devido à pandemia do novo coronavírus, os procedimentos descritos abaixo não foram desenvolvidos na prática. Houve apenas o aprendizado e redação dos procedimentos teóricos.



Figura 1. *Zygopetalum mackayi* Hook. no Pico do Garrafão, Biritiba Mirim, SP.



Figura 2. *Zygopetalum mosenianum* Barb. Rodr. no Pico do Garrafão, Biritiba Mirim, SP.



Figura 3. Raízes de *Zygopetalum mosenianum* Barb. Rodr. em ambiente natural.

Coleta das raízes e isolamento de fungos micorrízicos

As coletas foram realizadas no Pico do Garrafão, Biritiba Mirim, SP. Três raízes de três indivíduos diferentes de cada uma das espécies, totalizando seis amostras, foram coletadas com o auxílio de um bisturi esterilizado com álcool 70% e guardadas em um recipiente, enroladas em algodão umedecido com água destilada e armazenadas em bolsa térmica (Figura 3). Em seguida foram levadas ao laboratório para o isolamento dos fungos micorrízicos.

No laboratório, as raízes foram lavadas com água corrente por 10 minutos. Em seguida foi realizada uma desinfestação superficial imergindo em álcool 70% durante 1 min, depois em 3 min no hipoclorito de sódio 0.5% e finalizando com cinco lavagens em água destilada autoclavada. Foram feitos cortes transversais nas raízes de 2-3 cm com um bisturi esterilizado por álcool 70% ou hipoclorito de sódio após cada corte feito. Em seguida, as secções de raízes foram colocadas em placa de Petri no microscópio estereoscópio para o isolamento dos pélotons - conjuntos de hifas de fungos micorrízicos orquidóides. Os pélotons foram colocados no meio de cultura do tipo BDA para crescimento do micélio (Figura 4). As placas foram incubadas a 28°C e acompanhadas diariamente, para o isolamento direto do micélio crescido a partir do péloton, efetuando-se a transferência para outra placa contendo o mesmo meio.

Identificação morfológica

A identificação dos fungos micorrízicos foi baseada nas seguintes características morfológicas: diâmetro e tipos de ramificações das hifas, cor do micélio, velocidade de crescimento, número de núcleos por célula e a presença ou não de escleródios, estrutura do septo e formato das células monilioides.



Figura 4. Colônia de fungo micorrízico orquidoide em cultivo em meio BDA.

Extração do DNA

Foi realizada a maceração em almofariz de porcelana juntamente com nitrogênio líquido. Nesta etapa a parede celular da célula será quebrada. Posteriormente foi adicionado 150 ml da solução de lise (150 ml de água, 1 colher de sopa de sal e 1 colher de sopa de detergente incolor). A solução de lise tem função de rompimento das membranas celulares pela desestruturação dos lipídeos, mantendo o pH neutro para preservação das moléculas de DNA. A solução foi aquecida por 30 minutos a 60°C, tornando o ambiente favorável para que os componentes da solução possam atuar com eficácia. Em seguida, o macerado foi filtrado com auxílio de uma peneira e foi adicionado o mesmo volume de álcool 92% gelado. Alternativamente, pode-se adicionar clorofórmio (reagente que ajuda a levar os debris celulares maiores para a parte inferior do frasco), seguido de centrifugação da solução. O sobrenadante foi transferido para outro frasco contendo álcool, que ajuda o DNA a precipitar, tornando-o visível. Para aumentar a eficiência do processo de precipitação do DNA, deve-se levar o frasco ao freezer por 24h. Em seguida, o frasco passou por nova centrifugação, resultando em um pellet de DNA. Descartamos a primeira fase da mistura composta pelo álcool. Após o pellet estar completamente seco, foi adicionado 100 ml de água destilada. Para verificar se realmente há DNA na solução, fez-se necessário a produção de um gel de agarose.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR consiste no processo de replicação de um determinado fragmento de DNA que desejamos sequenciar. O PCR tem início com a adição de uma solução contendo a enzima DNA polimerase, iniciadores (cadeia de ácidos nucléicos que possui pares de bases complementares ao de uma fita do DNA), nucleotídeos e solução tampão (controlador de pH) ao material genético já extraído. Essa solução é então colocada em um equipamento denominado termociclador, onde ocorrem três fases fundamentais para a realização da multiplicação do fragmento desejado. Primeiramente, a máquina é programada à temperatura próxima de 95 °C para que seja feita a desnaturação, momento em que as fitas do DNA são separadas. Em seguida, a temperatura é reduzida para a temperatura de anelamento, que varia de acordo com os iniciadores utilizados (entre 45 °C - 65 °C) e os iniciadores são ligados à fita de interesse. Por último ocorre a fase de extensão, à temperatura de 72 °C, promovendo a ação da cópia da região de interesse pela

enzima polimerase, orientada pelo espaço limitado pelo primer anteriormente. O procedimento é repetido entre 30-45 ciclos para obter-se a quantidade suficiente da sequência alvo e sua análise sucede da eletroforese em gel.

Após a amplificação, as amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa MacroGen e editadas no programa CodonCode Aligner (Codon Code Corporation). As sequências consenso foram identificadas através do algoritmo de busca BLASTn, disponível no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A identificação das sequências está apresentada na Tabela 1. As duas orquídeas estudadas, *Z. mackayi* e *Z. mosenianum*, são colonizadas por fungos micorrízicos do gênero *Tulasnella*. Este é um gênero de distribuição mundial, comumente associado a orquídeas. Duas amostras distintas de fungos foram identificadas nas seis amostras coletadas. *Tulasnella orchidis* estava presente nas duas orquídeas (MMR1, MPR1 e MPR3) e foi anteriormente descrita em orquídeas de campos rupestres de Minas Gerais (Freitas et al. 2020) e identificada no Equador (Cruz et al, dados não publicados). Uma segunda espécie de *Tulasnella* ainda não descrita foi identificada para as amostras MMR2, MMR3 e MPR2. A mesma sequência já havia sido depositada no GenBank por Pereira & Kasuya (dados não publicados) a partir de coletas de *Epidendrum secundum*, uma orquídea comum em campos rupestres e também ocorrente no Pico do Garrafão.

Orquídea	Amostra	Código	E-value	Perc. Ident. (%)	ID
<i>Zygopetalum mackayi</i>	MMR1	KC152334	0.0	99.63	<i>Tulasnella</i> sp. DC271 clone C001
	MMR1	MN385730	0.0	99.21	<i>Tulasnella orchidis</i>
	MMR2	HQ127086	179 1,00E-	99.43	<i>Tulasnella</i> sp.
	MMR3	JX456568	0.0	98.78	<i>Tulasnella</i> sp.
<i>Zygopetalum mosenianum</i>	MPR1	KC152334	0.0	99.63	<i>Tulasnella</i> sp. DC271 clone C001
	MPR1	MN385729	0.0	99.74	<i>Tulasnella orchidis</i>
	MPR2	HQ127086	179 1,00E-	99.43	<i>Tulasnella</i> sp.
	MPR3	MN385730	0.0	100.0	<i>Tulasnella orchidis</i>

Tabela 1 – Fungos micorrízicos orquidóides identificados a partir da região ITS 1-2 rDNA nas espécies *Zygopetalum mackayi* Hook. e *Z. mosenianum* Barb.Rodr., ocorrentes no Pico do Garrafão em Biritiba Mirim, SP.

CONCLUSÕES:

- As espécies co-genéricas *Zygopetalum mackayi* e *Z. mosenianum* compartilham fungos micorrízicos orquidóides do gênero *Tulasnella*.
- Duas espécies de *Tulasnella* identificadas já foram descritas para outras orquídeas em localidades distintas (estado de Minas Gerais e Equador).

- Nossos resultados sugerem que esses fungos micorrízicos associados a orquídeas brasileiras apresentam ampla distribuição e podem ser utilizados para reintrodução de diferentes espécies ameaçadas de orquídeas.

BIBLIOGRAFIA:

BOLDRINI R.F., SANTOS W.O., CRUZ Z.M.A., RAMOS A.C. Bases da associação micorrízica orquidóide. **Natureza on line** 8, 140-145, 2010.

DRESSLER R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge, University Press, 1993.

FREITAS E.F.S., DA SILVA M., CRUZ E.D.S., MANGARAVITE E., BOCAYUVA M.F., VELOSO T.G.R., SELOSSE M-A, KASUYA M.C.M. Diversity of mycorrhizal *Tulasnella* associated with epiphytic and rupicolous orchids from the Brazilian Atlantic Forest, including four new species. **Scientific Reports** 10, 7069, 2020.

MORAES PL. Micorrizas. Brasil Escola. Acesso em:

<https://brasilecola.uol.com.br/biologia/micorrizas.htm>. Acesso em 09 de fevereiro de 2021.

REITER N, PHILLIPS RD, SWARTS ND, WRIGHT M, HOLMES G, SUSSMILCH FC, DAVIS BJ, WHITEHEAD MR, LINDE CC. Specific mycorrhizal associations involving the same fungal taxa in common and threatened *Caladenia* (Orchidaceae): implications for conservation. **Annals of Botany** 126, 943–955, 2020.

Toda Matéria. **Micorrizas**. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/micorrizas.htm>. Acesso em 09 de fevereiro de 2021.