



# Colonização de órgãos vegetativos da orquídea mico-heterotrófica *Wulfschlaegelia aphylla* (Sw.) Rchb.f. por fungos endofíticos

Palavras-Chave: haste floral, pelotons, raízes filiforme e fusiforme

Autoria:

MATHEUS PENA-PASSOS (PPGBV – UNICAMP)

LAÍS SOÊMIS SISTI (PPGBV – UNICAMP)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> JULIANA LISCHKA SAMPAIO MAYER (orientadora) (DBV, IB – UNICAMP)

Fomento: CNPq, CAPES / Agradecimento: INFABiC

## INTRODUÇÃO:

*Wulfschlaegelia aphylla* (Sw.) Rchb. f. é uma espécie de orquídea aclorofilada mico-heterotrófica, da subfamília Epidendroideae, que apresenta até 25 centímetros de altura e ocorre da América Central ao Paraguai, nos domínios brasileiros de Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (Melo e Alves, 2013; Menini Neto *et al.*, 2004). Essa espécie apresenta dois tipos de raízes morfológica e anatomicamente distintas entre si (Stern, 2014): as raízes denominadas fusiformes (FS, mais espessas e mais curtas, fixam o indivíduo ao substrato) e as raízes filiformes (FL, mais finas, se estendem por sobre o solo e abaixo da serrapilheira, conectando-se a folhas em decomposição por meio de hifas). Martos *et al.* (2009) isolaram fungos micorrízicos de *W. aphylla* proveniente da ilha de Guadalupe, Caribe, entretanto apenas de raízes FL. A maior parte dos fungos isolados foram classificados como saprotróficos, sendo basidiomicetos micenoides ou gimnopoides.

O **objetivo** do presente trabalho foi de identificar a presença de fungos endofíticos colonizando diferentes órgãos vegetativos (haste floral – HF – e raízes FL e FS) da espécie em questão, tanto por técnicas de microscopia quanto por isolamento de espécies fúngicas cultiváveis em meio ágar + nutrientes.

## METODOLOGIA:

**ISOLAMENTO DE FUNGOS CULTIVÁVEIS:** Amostras de raiz de *Wulfschlaegelia aphylla* (coleta em Itutinga, MG: 21°16'33.5"S 44°43'03.6"W, janeiro de 2020) foram utilizadas para isolamento de fungos endofíticos cultiváveis, conforme metodologia modificada de Araújo *et al.* (2001), Pereira *et al.* (2005) e Zettler & Corey (2018). As raízes FL e FS da espécie foram lavadas em água corrente, em seguida foi feita excisão de segmentos de aproximadamente 4 cm de comprimento com o auxílio de um bisturi. Os segmentos foram lavados em álcool 70% por 1 minuto e sucessivamente em hipoclorito de sódio (cloro ativo 2%) por 5 min e álcool 70% por 0,5 min. Por fim, foram lavados por duas vezes em água destilada autoclavada.

Os segmentos de 4 cm foram divididos em outros 4 segmentos e plaqueados em meio batata dextrose ágar (BDA) comercial (13 g/L) + ampicilina (75 µg/mL). Alíquotas de água da última lavagem também foram plaqueadas em meio para verificação da eficácia do processo de lavagem (esperando-se que não crescessem hifas nessas placas-controle). As placas foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro até que se

observaram crescimento de fungos a partir das raízes plaqueadas. Com finalidade de comparação, foram mantidas placas com raízes FL apenas e outras apenas com raízes FS. A frequência de isolamento (Araújo *et al.*, 2014) foi calculada para os tipos morfológicos de raiz conforme razão entre:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de fragmentos de raiz com crescimento fúngico}}{n^{\circ} \text{ total de fragmentos de raiz}}$$

As hifas que se desenvolveram nas placas com BDA foram estriadas, segundo diferenças morfológicas, em meio ágar água (AA) 10 g/L. Para isolamento dos fungos, quadrados de meio AA contendo micélio foram inoculados no centro de placas de BDA (39 g/L). Posteriormente, os fungos isolados foram estocados em água e em óleo mineral autoclavados.

**MICROSCOPIA:** amostras de haste floral (HF) e raízes FL e FS de *W. aphylla* da mesma coleta supracitada foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e posteriormente armazenadas em álcool etílico 70%. Parte das amostras foi utilizada para seccionamento à mão, tendo em vista que assim foram obtidas secções com maior espessura, facilitando a visualização de pelotons e hifas nos tecidos. Segmentos de raiz FL foram previamente escolhidos observando-se ao estereomicroscópio para identificação de áreas com evidente presença de rizomorfos. Segmentos de HF e raiz FS também foram processados para secções à mão. Essas secções de raízes e haste foram primeiramente visualizadas sem coloração e posteriormente receberam algum dos seguintes corantes (cada secção foi corada com apenas um deles):

- Azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão citrato pH 4,5. Corante diretamente sobre as secções, por ~ 3 minutos, depois lavadas em água destilada.
- Lactofenol azul de algodão (em inglês: LPCB – sigla em inglês) 0,05% (61335, Sigma-Aldrich). Corante diretamente sobre as secções, por ~ 10 segundos, depois lavadas em água destilada. O LPCB tem afinidade por quitina, componente de parede celular de fungos.
- Lugol (iodo 2%). Corante diretamente sobre as secções de raízes FS, por ~ 2 minutos, depois lavadas em água destilada. Objetivo: identificação de grãos de amido.

Parte das amostras (de HF, RFL e RFS) foi processada para microtomia: desidratação em série etílica e infiltração com resina plástica (Leica Historesin®). Subsequente seccionamento em micrótomo rotativo manual (Leica®) a 5 µm de espessura, coloração com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão citrato pH 4,5 e montagem em resina sintética “Entellan®” (Merck®). Tanto as secções manuais quanto em micrótomo foram documentadas por captura de imagens usando câmera de vídeo Olympus DP71 (Olympus®) acoplada ao microscópio Olympus BX51.

Ademais, secções à mão e secções incluídas em historesina, previamente selecionadas, foram utilizadas para microscopia confocal de fluorescência. Tais secções foram incubadas com:

- Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 488 (WGA-AF 488 – Life Technologies) 0,2 mg/mL, por 20 min e lavadas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 (Marques *et al.*, 2018).
- Em seguida, Calcofluor White 1% e lavadas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2.

Os filtros utilizados foram TC/GFP (excitação: 440-470; emissão: 525-550) para o WGA e o filtro DAPI (excitação: 358; emissão: 463) para o Calcofluor (Marques *et al.*, 2018). Tais análises foram executadas em microscópio upright LSM780-NLO Zeiss® para confocal, no Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABiC), sediado na UNICAMP.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Observações das raízes FL por microscopia de luz evidenciaram o esperado para esse tipo de raiz: numerosos pelotons foram identificados em cortes à mão (Fig. 1A-D) e por fluorescência (Fig. 1E-F), concentrados em células do parênquima cortical e com hifas que se projetam para a superfície do órgão (Fig. 1F) e formam rizomorfos que se conectam a materiais em decomposição, critério também utilizado na seleção de segmentos de raiz FL para secção. Tais resultados também foram observados por Martos *et al.* (2009), apesar de denominarem tal tipo de raiz como “raízes micorrízicas”. O isolamento de fungos endofíticos cultiváveis também demonstrou a presença de hifas em raízes FL (Tabela 1).

Curiosamente, quando se trata de raízes FS, observações por microscopia de luz não evidenciaram estruturas de peloton nesse tipo de raiz (Fig. 2A), mas numerosos grãos de amido (Fig. 2B-D), que podem ser interpretados como reserva de nutrientes à planta. Martos *et al.* (2009) denominam tais raízes de tuberosas e afirmam não serem colonizadas. Entretanto, imagens de fluorescência (Fig. 2E) e os resultados de isolamento de fungos cultiváveis (Tabela 1) demonstraram a presença de hifas colonizando tecidos de raízes FS. Há possibilidade que as hifas nessas raízes estejam pouco concentradas, dificultando visualização por microscopia de luz. De modo diferente do esperado, a frequência de isolamento e o número de isolados por critério morfológico foram maiores para FS quando comparado a FL (Tabela 1).

	<b>FL</b>	<b>FS</b>
Frequência de isolamento	~ 42,10%	~ 53,84%
Número de isolados por critério morfológico	9	13

Tabela 1 – Dados de frequência de isolamento e número de isolados por tipo de raiz (FL = filiforme, FS = fusiforme).

Em relação à HF, a microscopia de luz mostrou diversas hifas por todo o órgão, porém sem a organização de peloton (Fig. 3B-D). Essas características foram confirmadas pelos testes em microscopia de fluorescência (Fig. 3E-F). Considerando o desconhecimento dessa presença de hifas na HF e a lacuna de análise desse tecido na literatura, não foi realizado protocolo de isolamento usando tal tecido (o início desse procedimento foi anterior às análises anatômicas).

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS:

Conclui-se que há presença de hifas na espécie nos três tecidos analisados, além de reserva de nutrientes na forma de grãos de amido em raízes FS e rizomorfos que conectam raízes FL a materiais da serrapilheira que estão em decomposição. A organização de fungos endofíticos na HF não é em pelotons, e sim como hifas que não se enovelam.

Há perspectivas futuras de realização de protocolo de isolamento em BDA também para fungos cultiváveis da haste floral, seguindo o realizado para raízes. Além disso, concluir a extração de DNA dos isolados e sequenciar, identificando o gênero dos fungos cultiváveis obtidos dessas amostras. Mais testes de microscopia deverão ser realizados para exploração do padrão de colonização dos fungos nesses tecidos, explorando mais as raízes FS e ampliando tais análises para os órgãos reprodutivos.

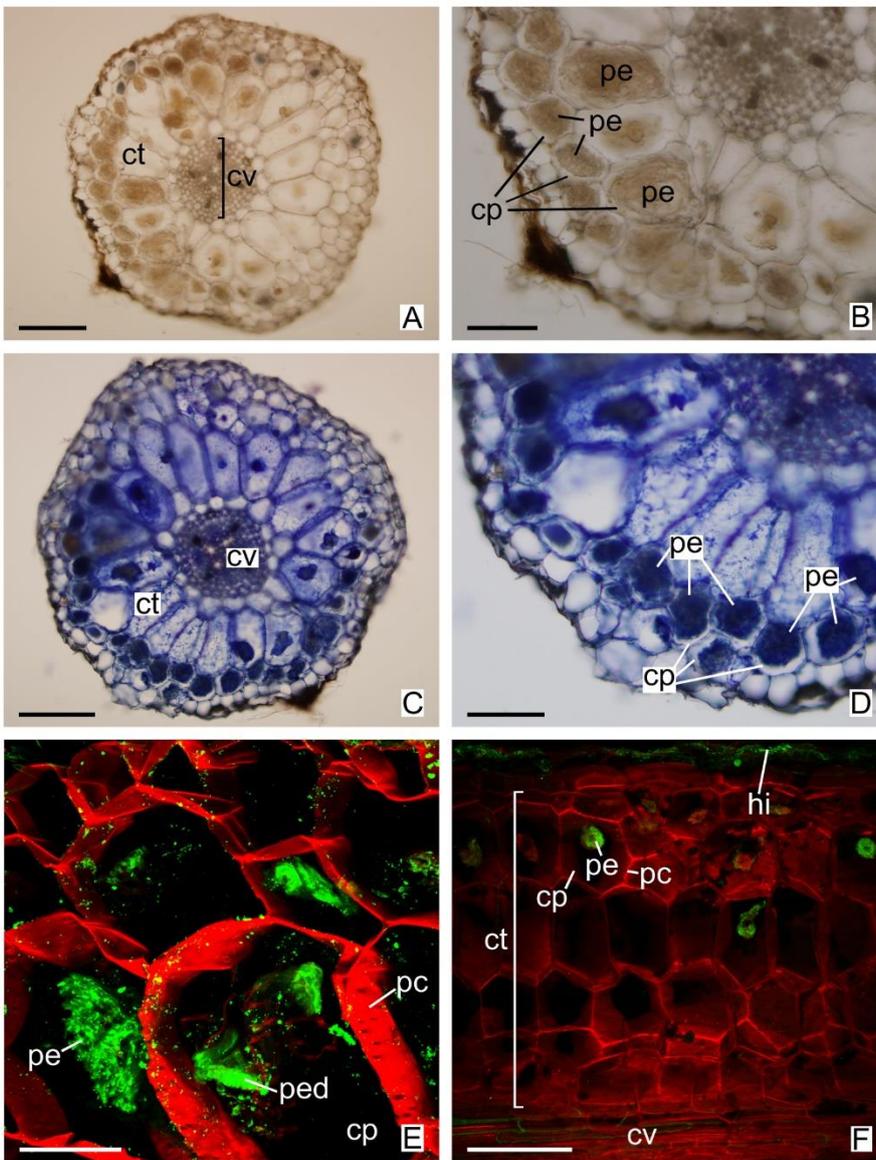


Fig. 1 - Secções transversais (A-E) e longitudinal (F) de raiz filiforme, todas realizadas à mão. Microscopia óptica sem o uso de corante (A-B) e com coloração por LPCB (C-D). Microscopia confocal de fluorescência com incubação em WGA-AF 488 + Calcofluor (E-F). cp: célula parenquimática do córtex, ct: córtex, cv: cilindro vascular, hi: hifas, pc: parede celular vegetal, pe: peloton, ped: peloton em degradação. Barras: A, C e F = 200  $\mu$ m; B e D = 100  $\mu$ m; E = 50  $\mu$ m.

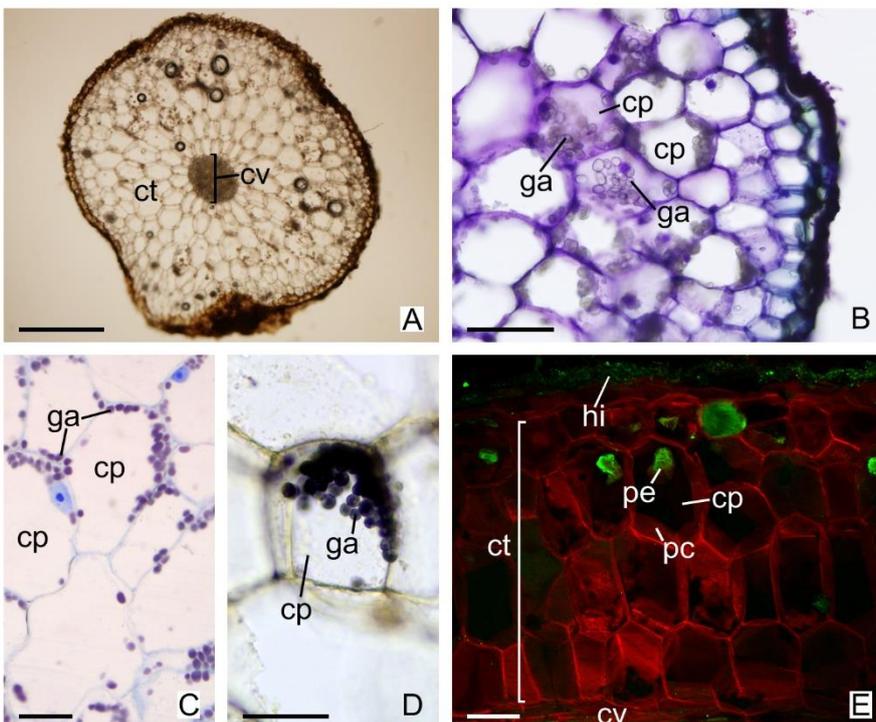


Fig. 2 - Secções transversais (A-D) e longitudinal (E) de raiz fusiforme. Microscopia óptica sem o uso de corante (A), com azul de toluidina (B), LPCB + lugol (C) e apenas lugol (D). Microscopia confocal de fluorescência com incubação em WGA-AF 488+Calcofluor (E). cp: célula parenquimática do córtex, ct: córtex, cv: cilindro vascular, ga: grão de amido, hi: hifas, pc: parede celular vegetal, pe: peloton. Barras: A = 500  $\mu$ m; B e E = 100  $\mu$ m; C e D = 50  $\mu$ m.

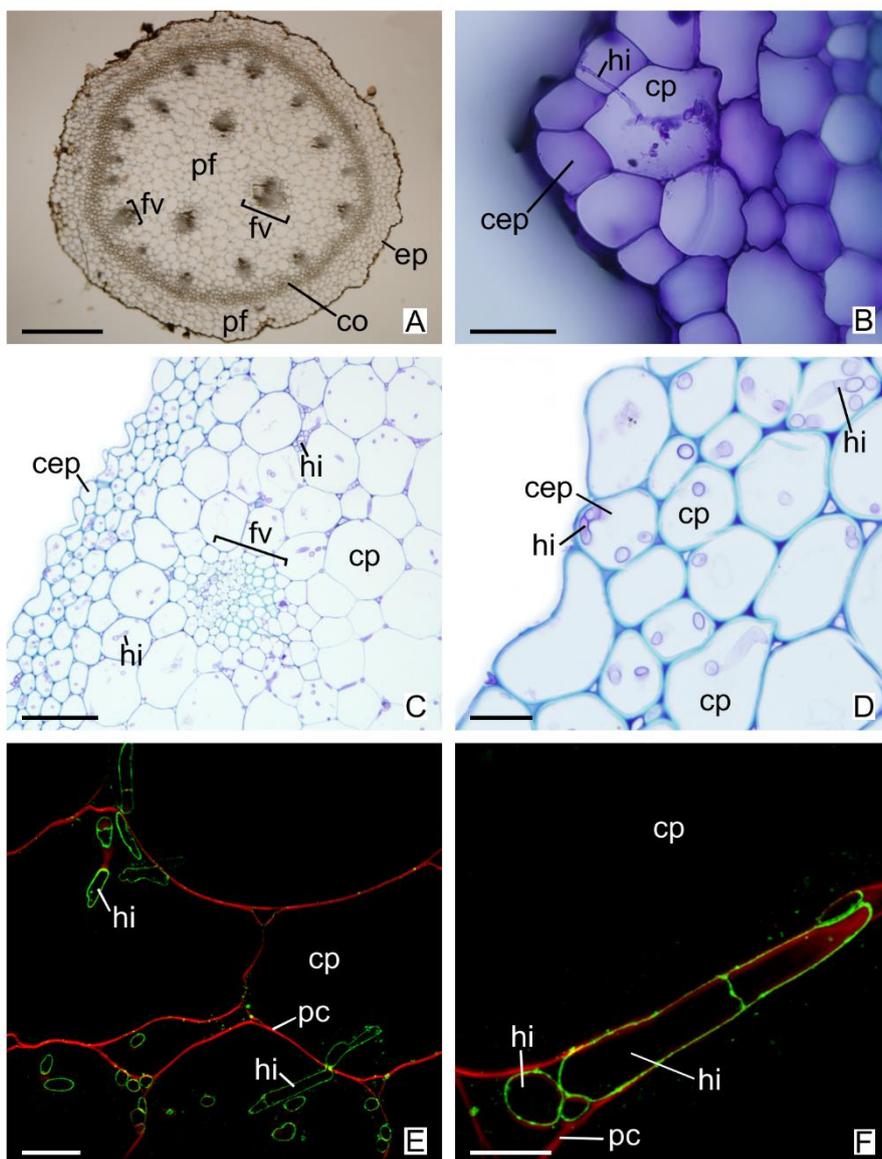


Fig. 3 - Secções transversais (A-F) de haste floral. Microscopia óptica sem o uso de corante (A) e com azul de toluidina (B-D). Microscopia confocal de fluorescência com incubação em WGA-AF 488 + Calcofluor (E-F). cep: célula epidérmica, co: colênquima, cp: célula parenquimática, ep: epiderme, fv: feixe vascular, hi: hifa, pc: parede celular vegetal, pf: parênquima fundamental. Barras: A = 500  $\mu$ m; B = 50  $\mu$ m; C = 100  $\mu$ m; D e E = 20  $\mu$ m; F = 10  $\mu$ m.

## BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO, W. L. *et al.* Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001
- ARAÚJO, W. L. *et al.* **Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização**. Santarém, UFOPA, 2014
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965
- MARQUES, J. P. *et al.* Sugarcane cell wall-associated defense responses to infection by *Sporisorium scitamineum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 698, 2018
- MARTOS, F. *et al.* Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. **New Phytologist**, v. 184, p. 668-681, 2009
- MELO, A.; ALVES, M. Sinopse das ervas aclorofiladas ocorrentes no norte da Floresta Atlântica, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, 2013
- MENINI NETO, L. *et al.* A família Orchidaceae na Reserva Biológica da Represa do Gramma-Descoberto, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 55, p. 137-156, 2004
- PEREIRA, O. L. *et al.* Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, p. 54-65, 2005
- SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, p. 247-249, 1973
- STERN, W. L. **Anatomy of the Monocotyledons volume X: Orchidaceae**. Oxford, Oxford University Press, 2014
- ZETTLER, L. W.; COREY, L. L. Orchid mycorrhizal fungi: isolation and identification techniques. In: **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses - Methods and Protocols**. New York, Humana Press, 2018.