

INVESTIGAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM CULTURAS AXÊNICAS DE MICROPLANTAS E CALOS DE *Cereus peruvianus*

Maria Gabrielly Nunes de Paula (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jesieli Beraldo Borrazzo (Coorientadora), Claudete Aparecida Mangolim (Orientadora).
E-mail: camangolim@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Ciências biológicas, Microbiologia, Microbiologia Aplicada.

Palavras-chave: Calos, Cactáceas, Endófitos.

RESUMO

Plantas ou culturas de células *in vitro* do tipo axênicas, indicam que o tecido vegetal é livre de toda e qualquer presença de microrganismos, sendo este um dos principais objetivos da técnica de micropropagação vegetal. Contudo, há a presença de microrganismos endofíticos latentes que resistem aos procedimentos de desinfestação. Microrganismos endofíticos habitam os tecidos internos das plantas sem causar sintomas prejudiciais visíveis, podendo contribuir para a resistência a patógenos, tolerância a estresses e melhoria na absorção de nutrientes. Sendo assim, este estudo investigou a presença de microrganismos endofíticos em culturas de calos de *Cereus peruvianus*, por meio de isolamento em placa contendo meios de cultivos específicos de crescimento bacteriano e fúngico e também por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados confirmaram a presença de microrganismos endofíticos nos tecidos internos de calos de *C. peruvianus*.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos são organismos que habitam os tecidos internos das plantas sem causar sintomas aparentes de patogenicidade. Esses microrganismos podem estabelecer interações simbióticas, mutualísticas ou comensais, contribuindo para a resistência a fitopatógenos, tolerância a estresses abióticos e melhoria na absorção de nutrientes (Esposito-Polesi NP 2011). Na micropropagação vegetal, a assepsia, compreendida como a ausência de microrganismos, é um requisito essencial para o estabelecimento e manutenção de culturas *in vitro*. Eventuais contaminações, quando ocorrem, são geralmente atribuídas a falhas nos processos de desinfestação ou no manuseio dos materiais biológicos. No entanto, mesmo em condições adequadas, colônias microbianas podem surgir após longos períodos de cultivo *in vitro*, especialmente sob condições de estresse, devido à presença de microrganismos endofíticos latentes que resistem aos procedimentos de desinfestação (Abreu-Tarazi et al. 2017). Desse modo, o termo plantas axênicas tem sido difundido como um dos principais objetivos da técnica de micropropagação, pois indica que a planta está livre de todo e qualquer

microrganismo (Paniker et al. 2007). Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar a presença de bactérias endofíticas intracelulares em culturas axênicas de calos de *Cereus peruvianus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção dos calos de Cereus peruvianus.

Os calos de *C. peruvianus* de mais 30 anos de cultivo e os calos recém induzidos são mantidos em meio de cultura MS contendo vitaminas B5, suplementado com 0,8% de ágar, 3% de sacarose, 10% de água de coco e uma combinação dos reguladores de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (4mg/L) e N-(2-furanilmetil)-1H-purina-6amina(cinetina) (4mg/L) de acordo com o método descrito por Oliveira et al., (1995). Os tecidos de calos foram formados a partir de caules de hipocótilo de plântulas de *C. peruvianus*, que cresceram a partir de sementes coletadas de uma única planta. As culturas de calos são mantidas a 32 ± 1 °C sob um fotoperíodo de 16 h de luz (15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, PPFD) e 8h escuro e repicados mensalmente.

Isolamento de bactérias e fungos endofíticos de cultura calos de Cereus peruvianus.

Fragmentos de aproximadamente 5mm dos calos de *C. peruvianus* foram macerados em meio TSB (Caldo Triptona de Soja, pH $7,3 \pm 0,2$), submetidos a agitação com 150 rpm durante 12h. Logo após, foram realizadas diluições seriadas de 1:10 (suspensões 10^{-1} e 10^{-2}) da suspensão, e estas foram semeadas em placas de Petri com meio TSA e BDA. As placas foram incubadas durante 72h à 28 °C.

A concentração de endófitos bacterianos por grama de tecido vegetal fresco foi calculada pelo número de colônias observadas em cada diluição. A coloração de Gram foi empregada para todas as bactérias isoladas.

Microscopia eletrônica de varredura internas de calos de Cereus peruvianus

Fragmentos de calos de *C. peruvianus* de aproximadamente 5mm foram fixados em solução de glutaraldeído 25% e tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Após o tempo de 24h de fixação, os tecidos foram transferidos para glicerol 30% por 30 minutos. Após, foram imersos em nitrogênio líquido, sendo feita a crio-fratura utilizando um bisturi. Os fragmentos foram então lavados em água destilada por 5 minutos e desidratados com soluções de concentração crescentes de álcool (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e duas vezes de 100%, 15 minutos cada), seguido de secagem utilizando aparelho de ponto crítico. A metalização com ouro ocorreu por meio da montagem de stubs com o material vegetal e a observação ocorreu em Microscópio Eletrônico de Varredura (Shimadzu SS-550).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das diluições realizadas foi possível o isolamento de dois tipos fungicos (Figura 01), os quais foram analisados por microscopia de luz, mas não foi possível sua identificação. Nesta análise, não houve o crescimento/isolamento de

bactérias. Porém, foi observado em uma das placas de calos, um crescimento de colônias bacterianas (Figura 02), a qual, foi então isolada e analisada por meio de coloração Gram. A análise de Gram indicou tratar-se possivelmente da presença de cocobacilos Gram positivos.

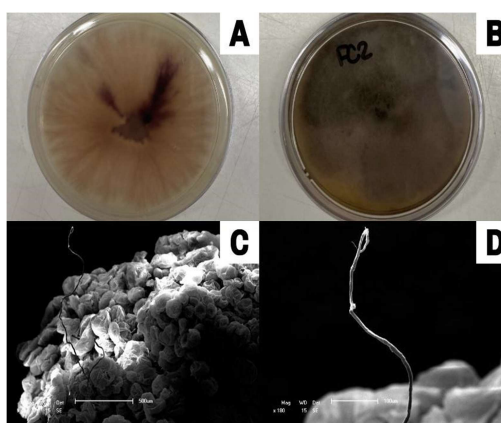


Figura 01– Fungos endofíticos de cultura de calos de *C. peruvianus*. A/B) Visualização macroscópica de fungos isolados do calo. C/D) Visualização de fungo em calo de *C. peruvianus* por MEV.

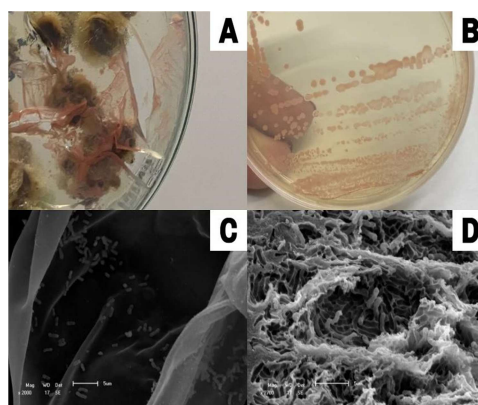


Figura 02 – Presença de colônias bacterianas em placa de cultura de calo de *C. peruvianus*. A) Placa observada com crescimento bacteriano. B) Isolamento das colônias. C) Visualização de formas bacilares em tecidos internos de calo por MEV. D) Biofilme bacteriano.

A análise de MEV permitiu a confirmação da presença de microrganismos endofíticos em tecidos internos de culturas de calos de *C. peruvianus*. Assim, foi observado a presença de fungos (Figura 01), e bactérias (Figura 03) em culturas de calos que se apresentavam saudáveis. De acordo com a visualização de MEV, a forma bacteriana encontrada na placa de calo que apresentou a formação de colônias, foi a forma bacilar. A mesma forma foi encontrada na placa que não apresentou a formação de colônias macroscópicas, o que reforça tratar-se da presença de bactérias endofíticas.

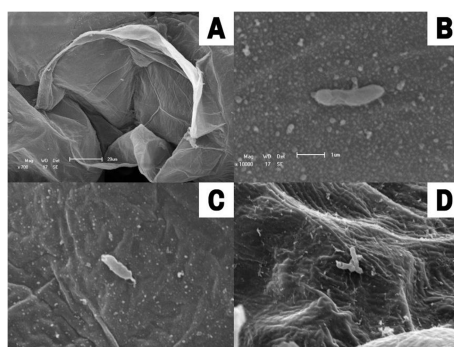


Figura 03 - Bactérias endofíticas de cultura de calos de *C. peruvianus* visualizadas por MEV. A/B/C e D) Bactérias do tipo bacilos encontradas em tecidos intracelulares dos calos.

CONCLUSÕES

Com os resultados conclui-se que os calos de *C. peruvianus* apresentam a presença de bactérias e fungos endofíticos, evidenciando que não são tecidos isentos da presença de microrganismos. Pesquisas futuras serão realizadas para a identificação molecular desses microrganismos e para compreender a contribuição simbiótica desses organismos, em nível metabolômico para a cultura de calos de *C. peruvianus*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Departamento de biologia celular, genética e biotecnologia (DBC), pelo suporte acadêmico e infraestrutura disponibilizados. Também agradeço à Fundação Araucária e CNPq, pelo apoio financeiro que tornou esta pesquisa possível.

REFERÊNCIAS

ESPOSITO-POLESI, N.P., de Abreu-Tarazi, M.F., de Almeida, C.V. *et al.* **Investigação da Comunidade Bacteriana Endofítica em Culturas Supostamente Axênicas de Abacaxi e Orquídeas com Evidências de Bactérias Intracelulares Abundantes.** *Curr Microbiol* 74: 103–113, 2017.

ESPOSITO-POLESI, N.P. **Microorganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas.** *Revista Brasileira de Biociências* 9: 533–541, 2011.

OLIVEIRA, A.S., Machado, M.F.P.S. Prioli, A.J. Mangolin, C.A. **In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae).** *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 31: 47-50, 1995.

PANICKER, B., Thomas, P., Janakiram, T., Venugopalan, R. Narayanappa, S.B. **Influence of cytokinin levels on in vitro propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria.** *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 43: 614-622, 2007.