IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS CULTIVÁVEIS DE CULTURAS AXÊNICAS DE MICROPLANTAS E CALOS DE *Cereus peruvianus* (Caryophyllales:Cactaceae)

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, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais, Maringá, PR.

Ciências biológicas, Microbiologia, Microbiologia Aplicada.

Palavras-chave: Microrganismos, rDNA, Identificação Molecular.

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. 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. A partir de técnicas dependentes de cultivo, um isolado bacteriano e dois isolados fúngicos foram obtidos de culturas axênicas de calos de *Cereus peruvianus* (Caryophyllales:Cactaceae) e foram preliminarmente identificados apenas com base em suas características morfológicas macro e microscópicas. Sendo assim, este estudo visou identificar molecularmente por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA e das regiões ITS1-5.8S-ITS2 de rRNA um isolado bacteriano e dois isolados fúngicos, respectivamente, de culturas axênicas de calos de *Cereus peruvianus* com o objetivo de determinar as espécies dos isolados. Os resultados das análises moleculares identificaram a presença de *Williamsia* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. 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 das plantas à fitopatógenos, à tolerância a estresses abióticos e à melhoria na absorção de nutrientes (ESPOSITO-POLESI, 2011).

Na micropropagação vegetal, a assepsia, compreendida como a ausência total de microrganismos, é um requisito fundamental para o estabelecimento e

manutenção de culturas *in vitro*. No entanto, mesmo sob condições adequadas de assepsia, colônias microbianas podem surgir após longos períodos de cultivo, especialmente sob condições de estresse, devido à presença de microrganismos endofíticos latentes que resistem aos procedimentos convencionais de desinfestação (ABREU-TARAZI et al., 2017).

Esses microrganismos são aqueles provenientes da colonização intracelular pela transferência vertical de endófitos que são latentes dentro dos tecidos vegetais, mas que não apresentam sintomas de colonização e não são eliminados pelos processos usuais de desinfestação (LACAVA et al., 2018). Portanto, seu crescimento em cultura de células vegetais é apenas uma resposta a algum desequilíbrio da condição *in vitro* (De Almeida et al., 2009). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi identificar molecularmente por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA e das regiões ITS1-5.8S-ITS2 de rRNA um isolado bacteriano e dois isolados fúngicos, respectivamente, isolados de culturas axênicas de calos de *C. peruvianus* com o objetivo de determinar as espécies com base em seus dados moleculares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Identificação molecular de fungos e bactérias endofíticas isoladas de cultura calos axênicas de C. peruvianus.

As extrações de DNAs genômicos fúngicos foram realizadas a partir de endófitos previamente cultivados por sete dias em meio BDA (Ágar Dextrose Batata, pH 6,8). Os micélios foram transferidos para tubos de 2 mL. Foram adicionados Tampão A (composto por Triton X-100, SDS 10%, NaCl 5M, Tris, EDTA e água Milli-Q), 200 mg de pérolas de vidro e uma mistura de Fenol, Clorofórmio e Álcool Isoamílico (25:24:1) nos tubos.

Os DNAs foram isolados e as amostras foram sequenciadas a partir dos produtos de PCR pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltd. (Ludwigbiotec). Os sequenciamentos foram realizados em um sequenciador MegaBACE TM 1000 (Amersham Biosciences).

Para a identificação da bactéria, foi realizada a técnica de PCR de colônia visando a amplificação da região 16S do rDNA. A amostragem do material genético consistiu no toque leve de uma ponteira estéril sobre a superfície de uma colônia isolada, transferindo-se a biomassa diretamente para o *mix* de PCR. Para promover a lise celular e a liberação do DNA genômico no meio de reação, o tubo foi submetido a um choque térmico preventivo, sendo mantido em freezer (-20 °C) por 15 minutos.

Para a identificação dos isolados endofíticos, as sequências nucleotídicas encontradas foram comparadas com as depositadas no banco de dados GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information Website*) utilizando a ferramenta BLASTn aplicando-se o filtro *'sequences from type materials'* para maior robustez dos dados. A identificação foi determinada baseando-se no melhor valor obtido quanto à similaridade. Para a análise filogenética, as sequências do banco de dados que apresentaram alta similaridade com as sequências obtidas, foram resgatadas e alinhadas utilizando o ClustalW no software MEGA (versão 6.05)

juntamente com as sequências dos isolados. A árvore filogenética foi construída com grupamento pelo método *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), usando p-distance para nucleotídeos com a opção "*the pairwise gap deletion*" e bootstrap com 10.000 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise filogenética possibilitou a separação dos isolados fúngicos em dois clados principais (Figura 1). A sequência P foi agrupada no clado I, pertencente ao gênero *Alternaria*. De acordo com as análises no BLASTn o isolado referente a sequência P apresentou 44% de homologia com a espécie *Alternaria tenuissima* (MK798750.1:53-516). Enquanto ao clado II, foi agrupado o fungo do gênero *Fusarium* (sequencia R), o qual apresentou 84% de identidade com a espécie *Fusarium fujikuroi* (KX674663.1:27-508).

De acordo com a análise no BLASTn, o isolado bacteriano apresentou 64% de identidade com a espécie *Williamsia sponjae* (MZ613178.1:54-657), e foi agrupada no clado com a mesma espécie na análise filogenética (Figura 2).

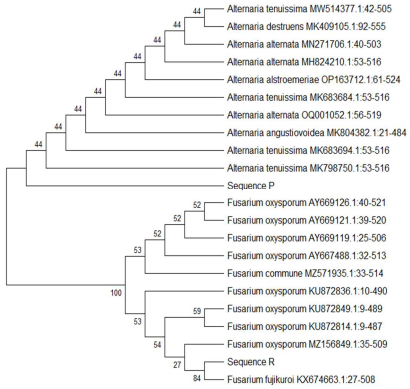


Figura 1 - Árvore filogenética dos isolados fúngicos encontrados em cultura de calos de *C. peruvianus*.

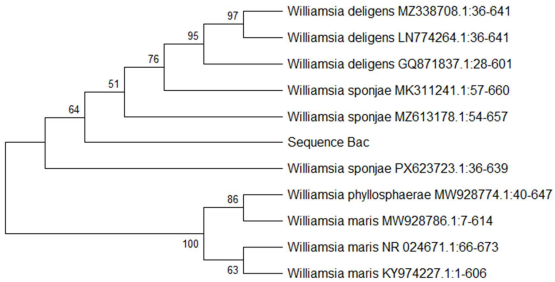


Figura 2 - Árvore filogenética do isolado bacteriano encontrado em cultura de calos de *C. peruvianus*.

Os microrganismos internos podem afetar diretamente as características fisiológicas, o crescimento e o microambiente celular do próprio calo, podendo induzir a síntese de produtos metabólicos de interesse.

CONCLUSÕES

As análises moleculares por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA e das regiões ITS1-5.8S-ITS2 de rRNA, possibilitaram a identificação dos isolados endofíticos de cultura de calos de *C. peruvianus* a nível de espécie para *Williamsia sponjae* e de *Alternaria tenuissima e Fusarium fujikuroi,* respectivamente. Pesquisas futuras serão realizadas 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 Centro de Ciências Biológicas (CCB), ao Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular (DBC), e ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (LCTEV) pelo suporte acadêmico e infraestrutura disponibilizados. Também agradeço à Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro que tornou esta pesquisa possível.

REFERÊNCIAS

ABREU-TARAZI, MONITA FIORI DE; ESPOSITO-POLESI, NATALIA PIMENTEL; et al. Investigation of Endophytic Bacterial Community in Supposedly Axenic Cultures of Pineapple and Orchids with Evidence on Abundant Intracellular Bacteria. **Current Microbiol.** v. 74, p. 103–113. 2017. Disponível em: 10.1007/s00284-016-1163-0. Acesso em: 11 agosto 2026

DE ALMEIDA, C.V. et al. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p. 1757-1764. 2009. Disponível: 0.1007/s11274-009-0073-8. Acesso em: 11 agosto 2026.

ESPOSITO-POLESI, NATALIA PIMENTEL. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências.** v. 9. P. 533–541. 2011. Disponível em: ISSN 1980-4849 (on-line). Acesso em: 11 agosto 2026.

LACAVA, P.T. et al. **Controle Biológico e Simbiótico de insetos-pragas e doenças por microrganismos endofíticos**. In: AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A.; QUECINE-VERDI, M.C.; LACAVA, P.T. **Biotecnologia Microbiana Ambiental.** Maringá: Eduem. p.83-104, 2018.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p. 406–425. 1987. Disponível em: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454. Acesso em: 11 agosto 2026.