

Caracterização dos fungos endofíticos das raízes de *Brachiaria brizantha* em Pirapemas-MA

Nascimento, B. A¹, Lima, N. C¹, Oliveira, N. L¹, Nascimento, A.S. M¹,
Ribeiro, L. N. A¹, Silva, L. C², Nobre, C. P³, Gehring, C⁴

1. Graduanda em engenharia agrônoma, UEMA/ Centro de ciências agrárias – CCA, e mails: beatryz_ev@hotmail.com; nathalyalc2011@gmail.com; nathalia.ariavilo@hotmail.com; adrielysa17@gmail.com; leanyribeiro93@gmail.com;
2. Mestranda em Agronomia e Ciência do Solo, UFRRJ, e-mail: luanacorreasilva2013@gmail.com
3. Doutora em Agronomia e Ciência do Solo, professora adjunta da UEMA, e-mail: camilaenobre@yahoo.com.br
4. Doutor em agroecologia Tropical, professor da UEMA, e-mail: christophgehring@yahoo.com.br

Resumo: A *Brachiaria brizantha* domina os pastos plantados em grande parte da Amazônia e parcialmente do cerrado também, são consideradas generalistas em suas associações micorrízicas, por isto são frequentemente utilizadas como plantas armadilha em estudos de micorrização, os tecidos das plantas armazenam uma comunidade de microrganismos diversificados, onde os que vivem dentro dos tecidos das plantas são chamados de endofíticos. Contudo, pouco se sabe sobre o comportamento ecológico e interação desses fungos com as raízes de braquiária. Portanto, o objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar morfologicamente os fungos endofíticos das raízes da braquiária. Este estudo foi executado em 4 pastos com capim braquiária (*Brachiaria brizantha* 'Marandú'). As amostras de raízes de babaçu foram coletadas durante o período seco (Junho-julho/2019), sob três distâncias, em quatro pastos no município de Pirapemas no Maranhão. As raízes foram levadas para o laboratório e em seguida foram desinfetada, cortadas e colocadas em meios de cultura seletivo para posterior isolamento. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$). 218 unidades formadoras de colônias foram obtidas das raízes braquiária, resultando em 9 gêneros: *Fusarium* (sp1, sp2, sp3, sp4 e sp5), *Aspergillus* (sp1, sp2), *Penicilium* (sp1), *Curvularia* (sp1). O gênero *Fusarium* apresentou maior abundância entre todas as distâncias e dentro da planta hospedeira, seguido pelo *Trichoderma* constituindo respectivamente 17,4%, da comunidade fúngica endofítica. *Aspergillus* sp1 mostrou maior abundância na raiz da braquiária na distância 'média'. O estudo apresentou 13 morfotipo, dentre estes o gênero *Fusarium* foi o mais predominante em todos os tratamentos.

Palavras chave: *Microorganismos, Plantas, Diversidade, Abundância.*

Characterization of endophytic fungi of *Brachiaria brizantha* roots in Pirapemas-MA

Abstract: The *Brachiaria brizantha* dominates the pastures planted in much of the Amazon and partly in the cerrado as well, they are considered generalists in their mycorrhizal associations, for this reason they are often used as trap plants in mycorrhization studies, the plant tissues store a community of diverse microorganisms, where those living inside the plant tissues are called endophytes. However, little is known about the ecological behavior and interaction of these fungi with brachiaria roots. Therefore, the objective of this work was to isolate and morphologically characterize endophytic fungi from brachiaria roots. This study was performed in 4 pastures with brachiaria grass (*Brachiaria brizantha* 'Marandú'). The babassu roots samples were collected during the dry period (June-July/2019), under three distances, in four pastures in the municipality of Pirapemas in Maranhão. The roots were taken to the laboratory and then were disinfected, cut and placed in selective culture media for further isolation. The data were submitted to Tukey's test ($p < 0.05$). 218 colony forming units were obtained from the brachiaria roots, resulting in 9 genera: *Fusarium* (sp1, sp2, sp3, sp4 and sp5), *Aspergillus* (sp1, sp2), *Penicilium* (sp1), *Curvularia* (sp1). The genus *Fusarium* showed the highest abundance among all distances and within the host plant, followed by *Trichoderma* constituting respectively

17.4%, of the endophytic fungal community. *Aspergillum* sp1 showed the highest abundance in the brachiaria root at the 'middle' distance. The study showed 13 morphotypes, among these the genus *Fusarium* was the most predominant in all treatments.

Key words: *Microorganisms, Plants, Diversity, Abundance.*

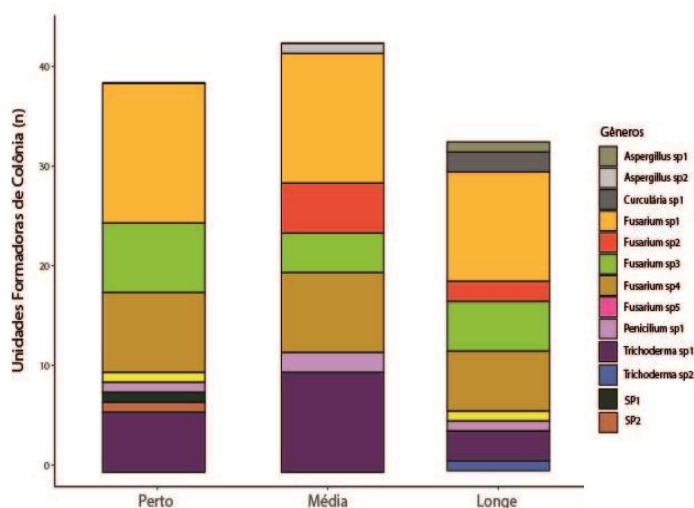
Introdução: A braquiária (*Brachiaria brizantha*) domina os pastos plantados em grande parte da Amazônia e parcialmente do cerrado também. Os efeitos ecológicos destes capins são ambivalentes, com fixação biológica de nitrogênio via associações especialmente com *Azospirillum amazonense*, *A. brasiliense* e outros (SCHUNKE, 2001) e aquisição de fósforo e outros nutrientes menos disponíveis por sua ampla associação com fungos micorrízicos arbusculares (DELBEM et al., 2010). Gramíneas do gênero *Brachiaria* ssp são considerados generalistas em suas associações micorrízicas, por isto são frequentemente utilizadas como plantas armadilha em estudos de micorrização (COVACEVICH; BERBARA, 2011; LEAL et al., 2009). Geralmente os tecidos da planta armazenam uma comunidade de microrganismos diversificados, que podem residir próximos ou sobre o tecido vegetal, onde são denominados epifíticos e os que vivem dentro dos tecidos das plantas são chamados de endofíticos (TURNER et al., 2013), estes estão presentes em todas as plantas e não colonizam somente um órgão específico da planta, os mesmo podem ser encontrados no interior dos frutos, flores, folhas, caules, e raízes, para serem detectados, é necessário o isolamento a partir da superfície esterilizada do vegetal (BACON; HILTON, 2007). Contudo, pouco se sabe sobre o comportamento ecológico e interação desses fungos com as raízes de braquiária. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar morfologicamente os fungos endofíticos das raízes da braquiária, afim de fornecer dados vitais para interpretação ecológica, além de possíveis recomendações de manejo.

Material e Métodos: A amostragem foi realizada em 4 pastos com capim braquiária (*Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf, cv 'Marandú'). que contém dispersos neles palmeiras de babaçu, resultando em 36 amostras de raízes de braquiária. Para a coleta selecionou-se fragmentos de raízes com cerca de 10 cm de comprimento tanto de Braquiária, onde posteriormente foram colocadas em tubos falcon (de 50 ml), higienizadas e refrigeradas para em seguida processar as amostras em no laboratório de solos – UEMA para posteriores análises. As raízes foram lavadas com água e sabão, A partir de cada amostra, as raízes foram desinfetadas por imersão em etanol a 95%, em seguida por hipoclorito de sódio (durante 5 minutos), e em seguida lavada três vezes com água estéril (AZEVEDO, 1998; SOBRAL et al., 2014). As raízes foram fatiadas em fragmentos de aproximadamente 1cm, onde os fragmentos centrais foram transferidos para meios apropriados, para o cultivo de fungos, batata-dextrose-ágar - BDA, adicionado do antibiótico Estreptomicina, e para as bactérias usou-se YMA, TSA, contendo o fungicida Folicur 200 ec . As unidades formadoras de colônias (UFC) foram caracterizadas através das suas características morfológicas iniciais, seguida da morfologia dos isolados puros, crescidos em meios específicos. Culturas que apresentaram as mesmas características foram preparadas lâminas de microscopia para fungo para uma melhor observação das estruturas do conídio. A análise dos dados foi baseada em Modelos Lineares Generalizados (GLM) utilizando a família de dados binomial negativa que foi escolhida através do método de dispersão de resíduos. Como a comunidade de fungos apresentou “overdispersion” e elevada média variância, nós aplicamos simulações de re-amostragens (pit trap e likelihood ratio) e iterações bootstrap com valores de p ajustados afim de reduzir o efeito da média/variância” e “super dispersão dos dados”. A interação entre as variáveis foi calculada através do valor de p ajustado para múltiplas interações utilizando o método de ‘free stepdown resampling

procedure’.

Resultados e Discussão: No total 218 unidades formadoras de colônias foram obtidas das raízes braquiária (Figura 1), resultando em 9 gêneros diferentes que foram representados pelos seguintes gêneros: *Fusarium* (sp1, sp2, sp3, sp4 e sp5), *Aspergillus* (sp1, sp2), *Penicillium* (sp1), *Curvularia* (sp1). O gênero *Fusarium* apresentou maior abundância entre todas as distâncias e dentro da planta hospedeira. O *Fusarium* representou mais de 71% da microbiota de fungos totais, seguido pelo *Trichoderma* constituindo respectivamente 17,4% da comunidade fúngica endofítica da braquiária. Os outros gêneros combinados representaram cerca de 12% dos fungos totais no babaçu e 20% na Braquiária.

Figura 1. Abundância e diversidade de fungos endofíticos em pastos do Babaçu monoespecíficos de Braquiária em três diferentes distâncias: perto, média e longe.



Os gêneros de fungos endofíticos das raízes Braquiária foram semelhantes aos levantados já em literatura, onde frequentemente vários gêneros como: *Arthrobotrys*, *Dendrophora*, *Diatrypella*, *Oudemansiella*, *Mucor* e *Phlebiopsis*, *Botryosphaeria*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Microdochium* e *Glomerella* (VIEIRA, 2008), e também *Neotyphodium*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Aternaria*, dentre muitos outros que são relatados em outros trabalhos, em clima tropical (ALMEIDA et al., 2005). O gênero *Fusarium* foi presente em todos os pastos, e apresentou maior número de morfotipos seguidos dos demais gêneros: *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*. O gênero *Fusarium* apresenta-se em maiores quantidades quando comparado a os outros gêneros, em muitos trabalhos esse comportamento é observado devido ao elevado número de espécies que o gênero apresenta. Como é visto em outros trabalhos de levantamento da diversidade de fungos endofíticos de raízes de soja que encontraram 42 fungos, e dentre estes isolados aproximadamente 70% eram do gênero *Fusarium* (FERNANDES et al., 2015). Apesar da abundância e diversidade a distância do babaçu e dominância da braquiária não afetaram os fungos endofíticos.

Conclusões: O estudo apresentou um total de 13 morfotipos de fungos endofíticos. O gênero *Fusarium* obteve maior destaque nas três distâncias amostradas, seguido pelo *Trichoderma*. O *Aspergillus* sp1 mostrou maior abundância na raiz da braquiária na distância ‘média’.

Referências Bibliográficas:

- ALMEIDA, C. D.; YARA, R.; ALMEIDA, M. D. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.5, p. 467-470, 2005.
- AZEVEDO, J.L. de. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. Ecologia microbiana. **Jaguariúna: Embrapa-CNPMA**, 1998.
- BACON, C.W.; HINTON, D.M. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: Plant-associated bacteria. **Springer Netherlands**, p. 155-194, 2007.
- COSTA, K.A. de P.; ROSA, B.; OLIVEIRA, I.P. de; CUSTÓDIO, D.P.; SILVA, D.C. Efeito da estacionalidade na produção de matéria seca e composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandú. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.6, n.3, p.187-193, jul./set. 2005.
- COVACEVICH, F.; BERBARA, R.L.L. Indigenous arbuscular mycorrhizae in areas with different successional stages at a tropical dry forest biome in Brazil. **African J Microbiol Res** v. 5, p. 2697-2705, 2011.
- DELBEM, F. C. et al. Colonização micorrízica e fertilidade do solo submetido a fontes e doses de adubação nitrogenada em *Brachiariabrizantha*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, 2010.
- FERNANDES, E. G.; PEREIRA, O. L.; DA SILVA, C. C.; BENTO, C. B. P.; DE QUEIROZ, M. V. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v. 181, p. 84-92. 2015.
- LEAL, L.P.; STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil. **Brazil Journal of Microbiology**, v. 40, p.111-121, 2009.
- SCHUNKE, R. M.. **Alternativas de manejo de pastagem para melhor aproveitamento do nitrogênio do solo**. Embrapa Gado de Corte, 2001.
- TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome biology** v. 14, n. 6, p. 209, 2013.