



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024**

Diversidade de fungos endofíticos associados ao Pinheiro Brasileiro (*Araucaria angustifolia*) no Parque Nacional de São Joaquim – Santa Catarina

Lara Leal Marques¹; Diogo Henrique Costa de Rezende²

1. Bolsista – Modalidade Bolsa/PVIC, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: laraleal1234@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: diogobiodh@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Fungi; *metabarcoding*; conservação de fungos.

INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos, classificados no Reino Fungi e ao domínio Eukarya. Atualmente, cerca de 148.000 espécies foram identificadas, principalmente nos filos Ascomycota e Basidiomycota, segundo Antonelli et al., (2020), embora o número total de espécies seja estimado entre 1,5 e 5,1 milhões como mostra Blackwell (2011); Hawksworth, Lucking (2017). Dentre os fungos com interações simbióticas com as plantas estão os fungos endofíticos. Estes organismos vivem em tecidos vegetais durante pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, sem causar uma doença ou efeitos negativos ao seu hospedeiro.

Tradicionalmente, a diversidade e a ecologia dos fungos podem ser estudadas pela contagem e identificação de espécimes/isolados baseados em características morfológicas e quando possível bioquímicas, principalmente a partir de espécimes coletados diretamente dos substratos (macrofungos) e espécimes cultivados “in vivo”. Os principais problemas com essas abordagens são que a real diversidade dos organismos é subestimada devido à típica efemeridade dos fungos, dificuldade de identificação de espécies crípticas e principalmente porque existem fungos não cultiváveis, que não podem ser isolados in vitro. Neste contexto, uma alternativa adequada para acessar a diversidade fúngica são métodos livres de isolamento e identificação morfológica, como os métodos de identificação molecular a partir de amostras ambientais. Entre este conjunto de métodos está a metagenômica, empregada primeiramente por Handelsman et al. (1998), que se baseia no sequenciamento de DNA (completo ou parcial) dos organismos de uma amostra ambiental.

Segundo Moreira (2013), dentre os hospedeiros dos fungos endofíticos está a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, espécie que é um componente importante da Floresta de Araucária, que faz parte da Mata Atlântica, um dos biomas mais diversos e mais ameaçados do Brasil. Cerca de 70 de espécies de fungos endofíticos foram isoladas de *A. angustifolia* (Moreira et al. 2013), sendo mais abundantes os gêneros *Pestalotiopsis* Steyaert e *Xylaria* Hill ex Schrank. da Silva et al. (2021) relata a ocorrência 135 espécies de fungos filamentosos saprotróficos, incluindo novos táxons, o registro de seis espécies raras e cinco espécies com afinidade por *A. angustifolia*, enfatizando a importância do estudo dos fungos associados à espécie.

Considerando que *A. angustifolia* e outras 13 espécies do gênero estão ameaçadas de extinção segundo IUCN (2024), o reconhecimento da funga associada a estes organismos

é relevante, pois os fungos associados a estas plantas também podem estar ameaçados como seus hospedeiros/substratos.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho são: (i) caracterizar a diversidade taxonômica e funcional da comunidade de fungos endofíticos associados a *A. angustifolia* no Parque Nacional de São Joaquim (PNSJ-SC) através de uma abordagem de metabarcoding, e, (ii) revisar o conhecimento atual sobre a diversidade da funga relacionada à espécie de *Araucaria* através de revisão de literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungos endofíticos associados à *A. angustifolia* por abordagem de metabarcoding

As expedições de coleta para obtenção de material para execução desse trabalho foram realizadas no ano de 2019 no Parque Nacional de São Joaquim, Santa Catarina. Durante a coleta, as folhas de *A. angustifolia* tiveram sua superfície esterilizada superficialmente por lavagem com água corrente, hipoclorito de sódio e álcool 70%, a fim de remover o microbioma do filoplano, permitindo o sequenciamento da comunidade endofítica. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e transportadas em temperatura ambiente para o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foram preservadas à -80 ° C até a realização deste trabalho.

Para o estudo da comunidade de fungos de *A. angustifolia* através da técnica de metabarcoding o primeiro passo é a padronização de um método de extração adequado para estas amostras em suas condições atuais. Sendo assim, o DNA metagenômico foi extraído de 250 mg de cada amostra usando o kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep de acordo com as instruções do fabricante ou utilizando uma adaptação do protocolo CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio). Posteriormente, o resultado do processo de extração utilizou-se a técnica da eletroforese em gel de agarose (1%), utilizando, por amostra, 4 microlitros tampão de corrida, 4 microlitros de “corante de DNA) e 2 microlitros da amostra, ou alternativamente, com inserção do corante de DNA diretamente no gel (5 microlitros). As amostras que apresentaram resultados positivos no processo de eletroforese (formação de banda de alto peso molecular) foram submetidas a quantificação por espectrofotometria com aparelho NanoDrop. Em todos os procedimentos, foram utilizados controles negativos (água ultrapura) e positivos (para extração uma amostra de tecido vegetal fresco e eletroforese uma amostra com resultado positivo em eletroforese).

Revisão de literatura sobre funga associada à *Araucaria*

Realizou-se uma revisão sistemática para identificar artigos científicos sobre fungos associados a espécies de araucária, utilizando o programa Publish or Perish 8 e as palavras-chave: Fungi OR Basidiom* OR Ascom* OR mycorrhiz* OR endophyt* OR fung* AND Araucaria, nas bases de dados Google Scholar e Pubmed, sem limitação de data. Essas bases de dados são reconhecidas por sua eficácia na coleta de informações para revisões sistemáticas, segundo Bramer et al. (2017). Artigos duplicados foram removidos manualmente. Selecionou-se artigos completos que mencionaram fungos associados diretamente à araucária, definidos como fungos que atuam como simbioses ou que utilizam a planta como substrato. Informações como autor, título, local da pesquisa, sistema utilizado, espécie do hospedeiro, parte do hospedeiro onde o fungo foi detectado e categoria do estudo foram tabeladas.

Adicionalmente, para identificar espécies de fungos associadas ao gênero *Araucaria* que não estão necessariamente citadas em artigos científicos, uma busca na API do Global Biodiversity Information Facility, de acordo com GBIF.org (2024) foi realizada para encontrar registros de fungos associados ao gênero *Araucaria* que não estivessem em

artigos científicos. Os registros recuperados foram filtrados manualmente para separar apenas aqueles associados diretamente às espécies de *Araucaria*. Os dados obtidos foram combinados com os táxons dos artigos, removendo duplicatas. Para entender as atribuições funcionais dos fungos, os registros recuperados dos artigos e da mineração de dados foram comparados com a base de dados FungalTraits (Pöhlme et al. 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fungos endofíticos associados à *A. angustifolia* por abordagem de metabarcoding

Foram extraídas 12 amostras utilizando o kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep e 13 amostras com o protocolo CTAB adaptado. Embora ajustes recomendados pelo fabricante tenham sido realizados (e.g. alteração no processo de ruptura, alteração no volume de eluição final e incubação de colunas). Nenhuma das amostras extraídas com o kit apresentou resultado positivo em eletroforese, resultando invariavelmente em ausência de detecção de DNA. Quando utilizado o método CTAB foi possível extrair o DNA com sucesso de algumas amostras, sendo recuperadas bandas de alto peso molecular, porém com nível considerável de degradação para algumas amostras, visível pelo arrasto nas bandas. As amostras com resultados positivos foram avaliadas quantitativamente, apresentando entre 115 e 258 nanogramas/microlitros e razão 260/280 entre 1.7 e 1.8.

Embora o método de liofilização e preservação a -80° C sejam amplamente utilizados para preservação de amostras a médio e longo prazo, como evidencia Nagy (2010), é possível que a dificuldade na obtenção de produtos de extração adequados desde o início das atividades do projeto pode ser devido ao tempo que as amostras estiveram armazenadas antes do procedimento de extração (2019-2023,24), bem como eventuais alterações nas condições preservação durante esse período (ex. quedas de energia).

Após a obtenção de resultados relativamente satisfatórios com a aplicação do método baseado no protocolo CTAB, não houve tempo hábil para enviar as amostras para sequenciamento.

Revisão de literatura sobre funga associada à *Araucaria*

Os estudos sobre fungos associados a Araucária se dividem em cinco categorias principais: Diversidade, Papel da micorrização, Filogenia, Caracterização de patógeno, Conservação e Ecologia. A categoria mais abordada é a Diversidade, destacando a identificação de várias espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na zona radicular de *Araucaria angustifolia*. Esta espécie é a mais referenciada, seguida de outras como *Araucaria araucana* e *Araucaria cunninghamii*. *A. angustifolia* é valorizada por seu impacto econômico e ecológico.

Mais de 630 espécies foram recuperadas como associadas diretamente à *Araucaria*, um número expressivo considerando que a funga de várias espécies do gênero é inexplorada. Líquens, fungos degradadores de madeira e patógenos vegetais foram os modos de vida mais abundantes. A alta percentagem de espécies fitopatógenas é um fator de interesse para conservação de espécies de *Araucaria*.

Araucaria angustifolia e outras espécies de araucária estão criticamente ameaçadas, assim como, potencialmente, fungos associados a elas. Exemplos incluem *Wrightoporia araucariae* Westph. & Reck, criticamente ameaçado por sua exclusividade em *Araucaria angustifolia* de acordo com IUCN (2020). No entanto, dentre as espécies recuperadas, apenas *W. araucariae* foi avaliada quanto ao seu estado conservação. As ameaças para araucárias e sua funga incluem uso de recursos biológicos, modificações ambientais, agricultura, produção de energia e mudanças climáticas (Mueller et al. 2022, IUCN 2024).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do apresentado, podemos concluir, de forma preliminar, que, embora com limitação de integridade e pureza, a utilização do protocolo CTAB teve resultado superior à do kit utilizado durante esse trabalho. A real eficácia do método será testada quando as amostras forem submetidas ao procedimento de sequenciamento de DNA. As amostras serão enviadas para uma empresa especializada no serviço. A região a ser sequenciada será o Espaçador Interno Transcrito 2 (ITS 2) do rDNA nuclear, utilizando plataforma Illumina, 2 × 250 pb paired-end reads. Considerando a revisão de literatura, nota-se que, no que tange a conservação de fungos, a funga associada a espécies de *Araucaria* representa uma importante lacuna de conhecimento, visto que este grupo de plantas é bastante ameaçado e abriga uma vasta funga que tem seu estado de conservação desconhecido, além de espécies que sequer foram estudadas quanto à sua funga associada. Como direcionamentos para pesquisas futuras, apontamos a necessidade do estudo de especialização de hospedeiro/substrato para as espécies aqui relatadas, e, para aquelas, especializadas na relação com essas plantas, avaliar seu estado de conservação com urgência.

REFERÊNCIAS

- ANTONELLI, A. et al. State of the World's Plants and Fungi 2020. Royal Botanic Gardens, Kew, 2020. Disponível em: https://stateoftheworldsplants.org/2020/sotwp_2020.pdf.
- BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? American Journal of Botany, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.
- BRAMER, W. M., Rethlefsen, M. L., Kleijnen, J. & Franco, O. H. (2017). Optimal database combinations for literature searches in systematic reviews: a prospective exploratory study. Systematic Reviews 6, 1–12.
- GBIF.org (2024), GBIF Home Page. Disponível em: <https://www.gbif.org> [20 Julho 2023].
- DA SILVA, S.S., Costa, L.A. & Gusmão, L.F.P. Diversity of saprotrophic filamentous fungi on *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Brazilian pine). *Braz J Microbiol* 52, 1489–1501 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00531-1>
- HANDELSMAN J, RONDON MR, BRADY SF, CLARDY J, GOODMAN RM. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5: R245–R249.
- HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 4, p. 1-17, 2017.
- IUCN. 2024. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2024-1. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on [12 setembro 2024].
- MOREIRA, M. G. Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- MUELLER, G. M., et al. (2022). What do the first 597 Global Fungal Red List assessments tell us about the threat status of fungi?. *Diversity*, 14(9), 736.
- NAGY, Z.T. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Org Divers Evol* 10, 91–105 (2010). <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0012-4>
- PÔLME, S., Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R. et al. FungalTraits: a user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. *Fungal Diversity* 105, 1–16 (2020).
- RAJCHENBERG M, ROBLEDO GL. (2013) Pathogenic polypores in Argentina. *Forest Pathology* 43: 171–184.