

Isolamento, identificação e avaliação do potencial biotecnológico de fungos associados a esporos de fungos micorrízicos arbusculares⁽¹⁾

Jéssica Campelo Martins de Moura⁽²⁾, Mário Sergius de Sousa e Silva⁽³⁾, Ana Carolina Binder D'Amato Horta⁽⁴⁾ e Francisco Adriano de Souza⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trabalho financiado pelo CNPq/Embrapa SEG. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC (ou BIC JR) do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED. ⁽⁴⁾ Bacharela em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽⁵⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

Resumo - Fungos micorrízicos arbusculares (MA) estabelecem simbiose com plantas atuando como extensões do seus sistemas radiculares. O micélio e os esporos dos fungos MA são nicho para diversos microrganismos, porém pouco se sabe sobre esses microrganismos, em especial, fungos que ocorrem em esporos de fungos MA. Neste sentido, este estudo teve por objetivo isolar, identificar e avaliar o potencial biotecnológico de fungos associados a esporos de fungos MA. Fungos filamentosos foram isolados de esporos desinfestados de fungos MA. Foram obtidas 44 estirpes, 16 foram identificadas por homologia com sequências depositadas no GenBank. O gênero mais frequente foi *Fusarium* (5), seguido de *Talaromyces* (4), *Aspergillus* (2), *Serendipita* (2), *Trichoderma* (2) *Clonostachys* (1). *Serendipita*, foram os únicos Basidiomycota, Agaricomycetes associados aos esporos de fungos MA avaliados. Dentre os gêneros encontrados temos fungos simbiotes de plantas (*Serendipita*), micofagos (*Trichoderma*), entomopatogênicos (*Clonostachys*) dentre outros com potencial **ação** fitopatogênica como *Fusarium* e *Aspergillus*. Nosso estudo demonstrou que esporos de fungos MA apresentam um micóbio associada diversa em termos de riqueza biológica e funcional. Pesquisas futuras são necessárias para avaliar o efeito sinérgico ou antagonista desses fungos em relação aos fungos MA.

Termos para indexação: Glomeromycota, esporos, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Serendipita*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, diversidade, micorizas.

Isolation, identification and evaluation of the biotechnological potential of fungi associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungi⁽¹⁾

Abstract - Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi establish symbiosis with plants acting as extensions of their root systems. The mycelium and spores of AM fungi are a niche for several microorganisms, but little is known about these microorganisms, especially fungi that occur in AM fungal spores. In this sense, this study aimed to isolate, identify and evaluate the biotechnological potential of fungi associated with AM fungal spores. Filamentous fungi were isolated from disinfected spores of AM fungi. A total of 44 strains were obtained, 16 of which were identified by homology with sequences deposited in GenBank. The most frequent genus was *Fusarium* (5), followed by *Talaromyces* (4), *Aspergillus* (2), *Serendipita* (2), *Trichoderma* (2) and *Clonostachys* (1). *Serendipita* were the only Basidiomycota - Agaricomycetes associated with AM fungal spores evaluated. Among the genera found, we have plant symbiotic fungi (*Serendipita*), mycophagous (*Trichoderma*) and, entomopathogenic fungi

(*Clonostachys*) among others with potential phytopathogenic action such as *Fusarium* and *Aspergillus*. Our study demonstrated that spores of AM fungi present a diverse associated mycota in terms of biological and functional richness. Future research is needed to evaluate the synergistic or antagonistic effect of these fungi in relation to AM fungi.

Index terms: Glomeromycota, spores, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Serendipita*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, diversity, mycorrhiza.

Introdução

Fungos micorrízicos arbusculares (MA), pertencentes ao filo Glomeromycota, são conhecidos por promover o crescimento de plantas (Azcón-Aguilar; Barea 1997; Baum et al., 2015; Khan et al., 2022). O micélio micorrízico estabelece simbiose com as raízes de plantas e é capaz de explorar os recursos do solo (água e nutrientes), com grande eficiência, e entregá-los as plantas em troca de açúcares e lipídios (Ferrol et al., 2019).

No solo os fungos MA interconectam diferentes plantas e interagem com diversos microrganismos (Turrini et al., 2018; Abdellatif et al., 2019). Identificar e avaliar o papel da microbiota associada a esses fungos é fundamental para entender sua ecologia e desenvolver tecnologias capazes de amplificar os benefícios da simbiose micorrízica.

Este estudo teve por objetivo isolar, identificar e avaliar o potencial biotecnológico de fungos associados a esporos de fungos MA.

Material e métodos

Culturas monoespecíficas de fungos MA mantidas em sistema de vasos de cultivo e vasos armadilha, foram utilizadas neste estudo. Os esporos foram extraídos de 50 mL de amostras do substrato dos vasos por peneiramento úmido (Gerdemann; Nicolson, 1963) e centrifugações em água e em solução açúcar à 50% (Jenkins, 1964). Posteriormente os esporos foram limpos em banho de ultrason por 4 vezes de 20 segundos cada ciclo. Seguido de desinfestação superficial conforme descrito por de Souza e Berbara (1999). Após desinfestação, os esporos foram distribuídos assepticamente em placas de Petri contendo meio MSR (Strullu; Romand, 1987) e incubados à 25 a 29 °C no escuro.

O crescimento de fungos filamentosos foi monitorado e quando presentes o micélio desses fungos foi transferido para novas placas de Petri contendo meio batata glucose agar comercial (Sigma-Aldrich 70139). Após isolamento em cultura pura, monoexpecífica, os fungos foram crescidos em meio MSR líquido suplementado com extrato de levedura. A biomassa obtida após 10 dias de cultivo foi colhida e utilizada para extração de ácidos dexoxirribonucleicos segundo de Souza et al. (2018).

O gene ribossomal nuclear (rRNA) foi amplificado e sequenciado com os primers ITS1F (Gardes; Bruns, 1993) e NDL22 (Van Tuinen et al., 1998) que amplificam a região ITS e as regiões D1 e D2 do 25S. Em seguida foram obtidas sequencias consenso e realizada análise BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch). A avaliação do potencial biotecnológico/função do fungo foi obtido por revisão bibliográfica com buscas na Web of Science (<https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>) utilizando-se o gênero ou espécie do fungo indentificado pela ferramenta BLASTN.

Resultados e discussão

Das 44 estirpes isoladas, 16 foram identificadas por homologia com sequências depositadas no GenBank através por análise BLASTN (Tabela 2). O gênero mais frequente foi *Fusarium* (5), seguido de *Talaromyces* (4), *Aspergillus* (2), *Serendipita* (2), *Trichoderma* (2) *Clonostachys* (1). *Serendipita*, foram os únicos Basidiomycota, Agaricomycetes associados aos esporos de fungos MA avaliados. Todas as demais espécies encontradas pertencem ao Filo Ascomycota. Sendo a maioria pertencentes a ordem *Hypocreales* exceto *Aspergillus* – ordem *Eurotiales*.

Dentre os gêneros encontrados *Serendipita* são considerados fungos micorrízicos da ordem Sebaciales (Weiß et al., 2016) e utilizados como bioinsumos para diversas espécies de plantas (Franken, 2012). Espécies de *Trichoderma* são utilizadas comercialmente como agentes de controle biológico de doenças fúngicas e como promotores do crescimento de plantas dentre outras aplicações biotecnológicas (Tyśkiewicz et al., 2022). O gênero *Clonostachys* apresenta fungos com ação endofítica, micofago e entomopatogênica (Kaewchai et al., 2009; Anwar et al., 2018; Mascarin et al., 2022). *Talaromyces* tem potencial para produção de antibióticos e pigmentos (Santos et al., 2015; Parul et al., 2020). Diversas espécies de *Aspergillus* tem potencial biotecnológico principalmente para a produção de enzimas e ácidos orgânicos (ácido cítrico, glucônico e gálico) (Li et al., 2009; Nascimento et al., 2021; Bhunjun et al., 2024), porém algumas espécies causam doenças em seres humanos (<https://pt.wikipedia.org/wiki/Aspergillus>). *Fusarium* são frequentemente associados à doenças em plantas e produzem micotoxinas (<https://pt.wikipedia.org/wiki/Fusarium>).

Tabela 1. Estirpes de fungos isoladas de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e sua identificação ao nível de gênero por BlastN e seu potencial biotecnológico.

Estirpe	Gênero	BlastN	Similaridade (%)	Acesso	Potencial
2	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>	97,04	KF918581	Patógeno de plantas (Arie 2019)
3	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	98,31	MH877076	Produção de Pigmentos (Parul et al. 2020)
4	<i>Clonostachys</i>	<i>C. rosea</i>	100	KX958035	Controle Biológico ; (Anwar et al. 2018, Kaewchai et al. 2009; Mascarin et al. 2022)
5	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	96,7	MH877076	Produção de Pigmentos (Parul et al. 2020)
7	<i>Aspergillus</i>	<i>A. pseudodeflectus</i>	97,6	OL711759	Produção de ácidos orgânicos, fitase (Li et al. 2009; Nascimento et al. 2021)
9	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	97,6	OQ550089	Produção de Pigmentos (Parul et al. 2020)
10	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>	97,6	MH055400	Patógeno de plantas
11	<i>Serendipita</i>	<i>Serendipita sp.</i>	99,51	KC176327	Micorrizas (Franken 2012)
12	<i>Trichoderma</i>	<i>T. asperillum</i>	99,06	KR856222	Controle Biológico (Tyśkiewicz et al. 2022)
13	<i>Fusarium</i>	<i>F. verticillioides</i>	97,14		Patógeno de plantas
32	<i>Serendipita</i>	<i>Serendipita sp.</i>	99,51	KC176327	Micorrizas (Franken 2012)
34	<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i>	97,27	KR856210	Controle Biológico (Tyśkiewicz et al. 2022)
35	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium sp.</i>	95,38	GU170637	Patógeno de plantas (Arie 2019)
37	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	92,13	OP237480	Produção de ácidos orgânicos, fitase (Li et al. 2009; Nascimento et al. 2021)
38	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	92,5	LT558946	Produção de Pigmentos (Parul et al. 2020)

Conclusão

Esporos de fungos MA apresentam uma micota associada diversa em termos de riqueza biológica e funcional. No entanto, pesquisas futuras são necessárias para avaliar o efeito sinérgico ou antagonista desses fungos em relação aos fungos MA e sua contribuição para o desenvolvimento de plantas.

Referências

- ABDELLATIF, L.; LOKURUGE, P.; HAMEL, C. Axenic growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* and growth stimulation by coculture with plant growth-promoting rhizobacteria. **Mycorrhiza**, v. 29, p. 591-598, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00924-z>.
- ARIE, T. Fusarium diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. **Journal of Pesticide Science**, v. 25, n. 4, p. 275-281, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03>.
- ANWAR, W.; ALI, S.; NAWAZ, K.; IFTIKHAR, S.; JAVED, M. A.; HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E. F.; AKHTER, A. Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 8, p. 750-760, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1487030>.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, v. 68, p. 1-24, 1997.
- BAUM, C.; EL-TOHAMY, W.; GRUDA, N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 187, p. 131-141, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.002>.
- BHUNJUN, C. S.; CHEN, Y. J.; PHUKHAMSAKDA, C.; BOEKHOUT, T.; GROENEWALD, J. Z.; MCKENZIE, E. H. C.; FRANCISCO, E. C.; FRISVAD, J. C.; GROENEWALD, M.; HURDEAL, V. G.; LUANGSA-ARD, J.; PERRONE, G.; VISAGIE, C. M.; BAI, F. Y.; BŁASZKOWSKI, J.; BRAUN, U.; SOUZA, F. A. de; QUEIROZ, M. B. de; DUTTA, A. K. et al. What are the 100 most cited fungal genera? **Studies in Mycology**, v. 108, n. 1, p. 1-412, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3114/sim.2024.108.01>.
- FERROL, N.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PÉREZ-TIENDA, J. Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: an overview on the mechanisms involved. **Plant Science**, v. 280, p. 441-447, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>.
- FRANKEN, P. The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: Potential application and the biology behind. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1455-1464, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4506-1>.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0).

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

KAEWCHAI, S.; SOYTONG, K.; HYDE, K. D. Mycofungicides and fungal biofertilizers. **Fungal Diversity**, v. 38, p. 25-50, 2009.

KHAN, Y.; SHAH, S.; TIAN, H. The roles of arbuscular mycorrhizal fungi in influencing plant nutrients, photosynthesis, and metabolites of cereal crops: a review. **Agronomy**, v. 12, n. 9, 2191, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12092191>.

LI, G.; YANG, S.; LI, M.; QIAO, Y.; WANG, J. Functional analysis of an *Aspergillus ficuum* phytase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its root-specific, secretory expression in transgenic soybean plants. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 8, p. 1297-1303, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9992-6>.

MASCARIN, G. M.; SILVA, A. V. R. da; SILVA, T. P. da; KOBORY, N. N. *Clonostachys rosea*: production by submerged culture and bioactivity against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 851000, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.851000>.

NASCIMENTO, J. M. do; NETTO, J. A. F. V.; VALADARES, R. V.; MENDES, G. de O.; SILVA, I. R. da; VERGÜTZ, L.; COSTA, M. D. *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 156, 108190, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108190>.

PARUL; THIYAM, G.; DUFOSSÉ, L.; SHARMA, A. K. Characterization of *Talaromyces purpureogenus* strain F extrolites and development of production medium for extracellular pigments enriched with antioxidant properties. **Food and Bioprocess Processing**, v. 24, p. 143-158, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.012>.

SANTOS, F. F. dos; NASCIMENTO, M. R. F. do; CARVALHO, D. B. de; LEÃO, M. H. M. da R.; AMARAL, P. F. F. Identificação e produção de pigmento por fungo *Talaromyces* sp. In: SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, 5., 2015, Londrina. **Anais...** São Paulo: Blucher, 2015. p. 131-134. DOI: <https://doi.org/10.5151/biochem-vsimbte-22061>.

SOUZA, F. A. de; BERBARA, R. L. L. Ontogeny of *Glomus clarum*, in Ri T-DNA transformed roots. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 343-350, 1999.

SOUZA, F. A. de; SILVA, I. R. da; BARRETO, M. B. B. de B.; OEHL, F.; GOTO, B. T.; MAIA, L. C. *Racocetra crista* (Glomeromycotina) delimited by integrative evidence based on morphology, long continuous nuclear rDNA sequencing and phylogeny. **Mycological Progress**, v. 17, p. 999-1011, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1410-9>.

STRULLU, D. G.; ROMAND, C. Culture axénique de vésicules isolées à partir d'endomycorhizes et ré-association in vitro à des racines de tomate. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 292, p. 153-156, 1987.

TURRINI, A.; AVIO, L.; GIOVANNETTI, M.; AGNOLUCCI, M. Functional complementarity of arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota: the challenge of translational research. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 10-13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01407>.

TYŚKIEWICZ, R.; NOWAK, A.; OZIMEK, E.; JAROSZUK-ŚCISEŁ, J. Trichoderma: the current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, 2329, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>.

VAN TUINEN, D.; JACQUOT, E.; ZHAO, B.; GOLLOTTE, A.; GIANINAZZI-PEARSON, A.

Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25s rDNA-targeted nested PCR. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 7, p. 879-887, 1987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x>.

WEIß, M.; WALLER, F.; ZUCCARO, A.; SELOSSE, M.-A. Sebacinales - one thousand and one interactions with land plants. **New Phytologist**, v. 211, p. 20-40, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13977>.