

## **Avaliação de potenciais endófitos para biocontrolo contra a doença do Carvão do Entrecasco do *Quercus suber L.***

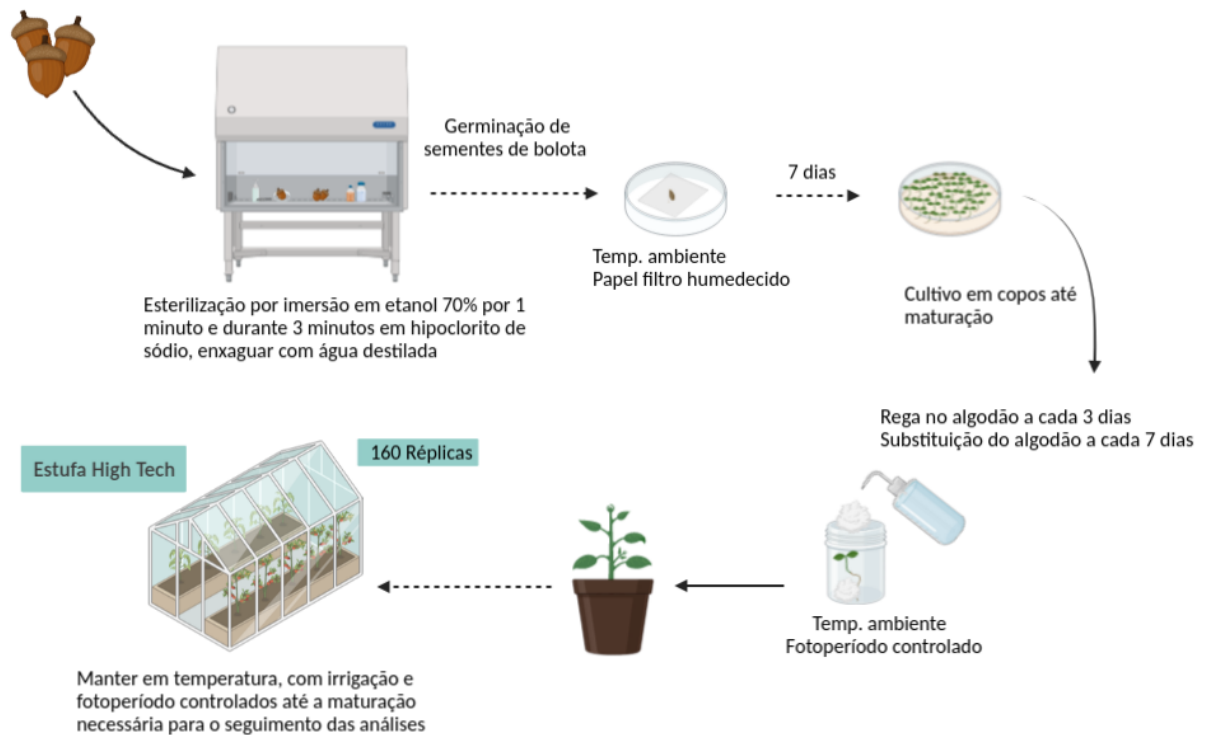
Alice Sequeira 57828, Ana Vilaverde 52663, Catarina Macedo 52705, Diana Mora 57856

### **Introdução**

O sobreiro (*Quercus suber L.*) é uma espécie de elevada importância na região Mediterrânica. Além da sua importância ecológica, apresenta também uma relevância enorme para a economia Portuguesa [1], uma vez que 80% da cortiça produzida mundialmente vem da Península Ibérica, na qual Portugal é responsável por quase metade da produção global total [2][3]. No entanto, a sustentabilidade do sobreiro será potencialmente ameaçada pela diminuição da disponibilidade de água na região do Mediterrâneo, prevista pelas alterações climáticas, e à ocorrência de doenças que afetam cada vez mais o seu desenvolvimento normal [1]. O carvão do entrecasco, causado pelo fungo *Biscogniauxia mediterranea (Bm)*, é uma das doenças do sobreiro que, conseqüentemente, origina um acentuado declínio na árvore, podendo levar à sua morte [4]. Uma vez que os tratamentos através de fungicidas são os mais utilizados para o combate deste problema, o risco ambiental e a toxicidade deste processo levam à necessidade da utilização de outros métodos eficazes [4]. Sendo assim, estratégias mais ecológicas, como o uso de agentes de luta biológica, sobretudo microrganismos que colonizam as plantas [5], é uma possível abordagem para responder a este desafio. Estes microrganismos colonizam a superfície (colonização epifítica) ou os tecidos internos (colonização endofítica) das plantas [5][6]. Posto isto, este trabalho tem como hipótese perceber se endófitos têm potencial de biocontrolo contra a Doença do Carvão do Entrecasco.

### **Germinação *in vitro*:**

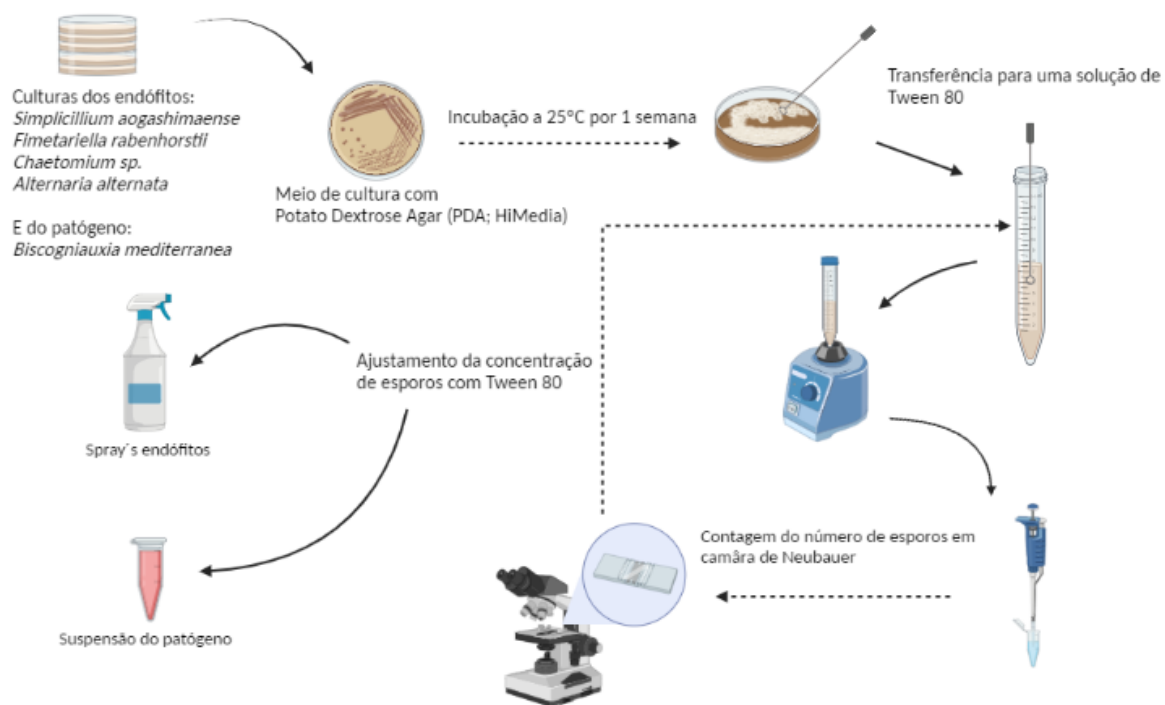
Começar-se-á por esterilizar sementes de bolota (fruto do sobreiro) por imersão em etanol 70% (v/v) durante 1 minuto, seguido, hipoclorito de sódio 3% durante 1 minuto, e, por fim 5 vezes (1 minuto cada) em água destilada estéril [7]. Depois, proceder-se-á à germinação em caixas de Petri com papel de filtro humedecido a temperatura ambiente por 7 dias, e posterior cultivo em copos com temperatura ambiente e fotoperíodo controlado até à maturação. Têm-se em atenção regas periódicas a cada 3 dias e substituição do algodão a cada 7 dias [8]. Após a maturação, transferem-se as plântulas para vasos, em estufa High Tech, em temperatura e fotoperíodos controlados, com irrigação, por aproximadamente 3 anos, altura prevista para o seguimento das análises (Fig. 1) [9].



**Fig. 1** - Representação esquemática da germinação de sementes de bolota e maturação em plântulas de sobreiro.

### **Microrganismos, preparação de inóculos e suspensões fúngicas:**

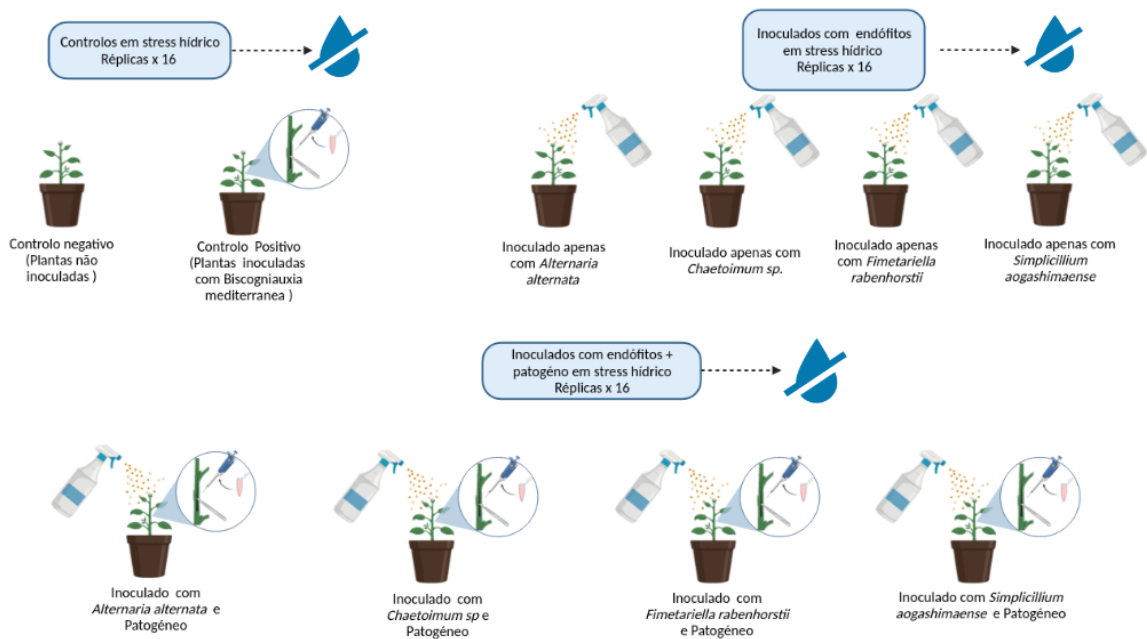
Após uma leitura minuciosa por vários artigos, verificou-se que já há vários endófitos identificados. Sendo assim, selecionar-se-ão 4 para estudo, *Simplicillium aogashimaense* (Sa), *Fimetariella rabenhorstii* (Fr), *Chaetoimum sp.* (Ch sp.) e *Alternaria alternata* (Aa), visto terem potencial para inibir o crescimento de *Biscogniauxia mediterranea in vitro* em co-cultura [4]. Assim, estes serão testados quanto à sua capacidade em inibir o desenvolvimento da doença do carvão no sobreiro. As culturas usadas serão adquiridas por colaboração. Posto isto, recorrer-se-á à replicação do seu cultivo, em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA; HiMedia). A incubação das culturas será efetuada a 25 °C durante uma semana e, ao fim deste tempo utilizar-se-á estas culturas microbianas para preparar as suspensões de inóculos necessários para a realização dos bioensaios. [10] Para a preparação de inóculos fúngicos, discos de micélio (0,5 cm de diâmetro), retirados da placa de petri, posteriormente transferidos para tubos Falcon de 25 mL contendo 20 mL de Tween 80 a 0,03% (v/v). Após agitação em vórtex, número de esporos será determinado através da contagem ao microscópio ótico Leica DM500 utilizando-se uma câmara de Neubauer (Fig. 2). [11]



**Fig. 2** - Representação esquemática da inoculação dos fungos em meio de cultura, e preparação das suspensões.

### **Bioensaio para seleção de potenciais agentes de biocontrole:**

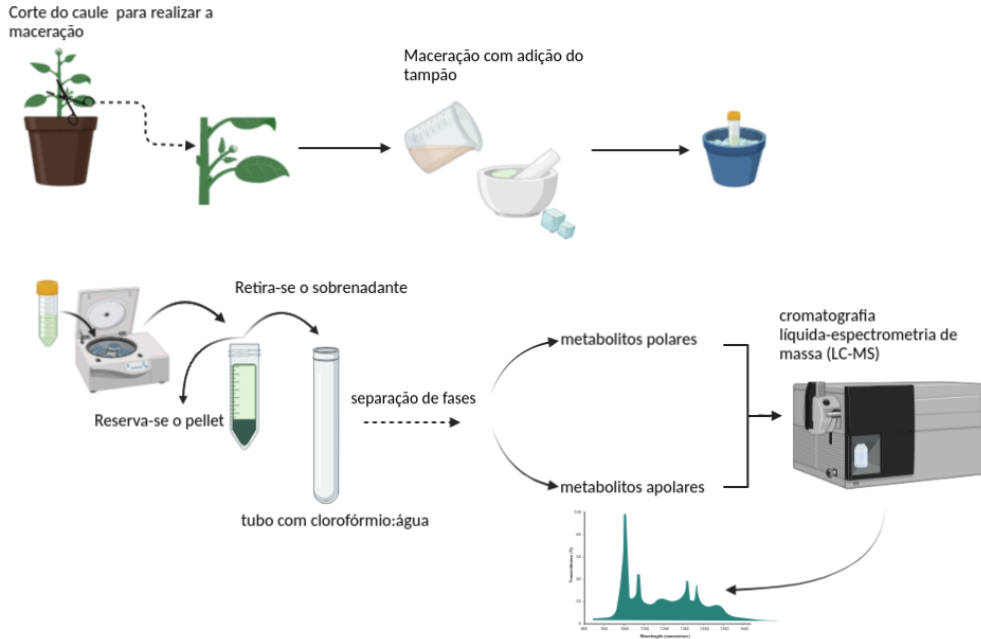
Após a obtenção das 160 plântulas, recorrer-se-á ao procedimento do bioensaio, para tal, todas serão expostas a stress hídrico, uma vez que o patógeno torna-se patogénico sob condições de stress[14]. Posteriormente, criar-se-ão os seguintes grupos experimentais com 16 réplicas cada um: controlo negativo (plântulas não inoculadas), controlo positivo (plântulas inoculadas com *Bm*), plântulas inoculadas com *Aa*, plântulas inoculadas com *Ch sp.*, plântulas inoculadas com *Fr*, plântulas inoculadas com *Sa* e, por fim, plântulas inoculadas com cada um dos endófitos mais o patógeno. Além disso, para a introdução do patógeno irá se efetuar um corte no caule e, com recurso a uma pipeta, introduzir-se-á o patógeno no local da ferida. Já os endófitos serão pulverizados sobre a plântula (Fig. 3). Posteriormente, realizar-se-á a classificação fenotípica, onde as plântulas serão avaliadas em intervalos semanais, com o intuito de verificar possíveis alterações, no decorrer do estudo, sendo que, quando observadas, devem ser reportadas e medidas. Dentro das alterações causadas pelo patógeno, deverá-se ter especial atenção, no surgimento de rachaduras no caule, estromas de carbonáceo, descoloração e o murchar das folhas [9].



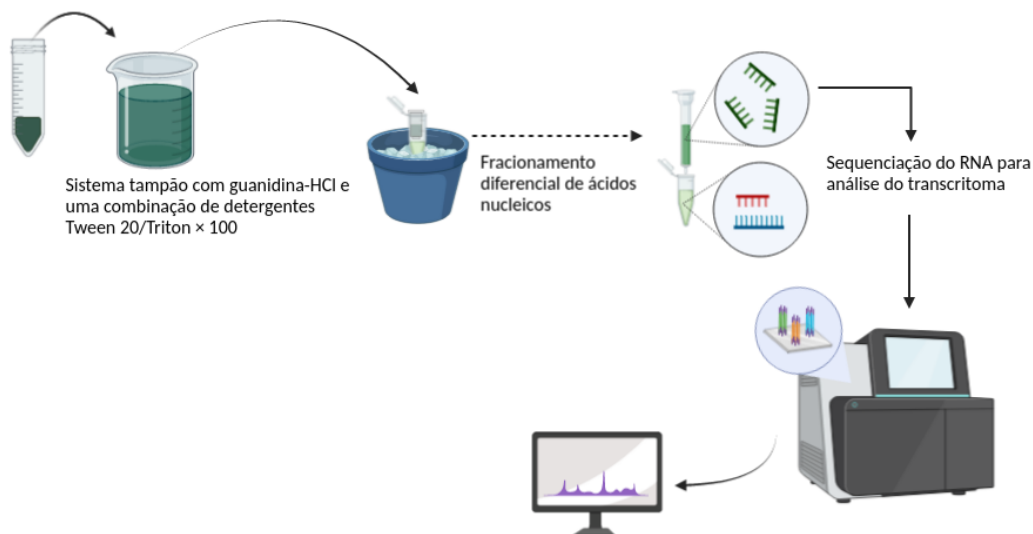
**Fig. 3** - Criação dos grupos experimentais por inoculação por spray com as suspensões fúngicas, sob condição de stress hídrico. [Topo, esquerda] Controlo positivo (plantas não inoculadas) e controlo negativo (plantas inoculadas com *Biscogniauxia mediterranea*). [Topo, direita] Inoculados somente com *Alternaria alternata* (*Aa*), *Chaetium sp.* (*Ch sp.*), *Fimetariella rabenhorstii* (*Fr*), *Simplicillium aogashimaense* (*Sa*). [Baixo] Inoculados com *Aa+Bm*, *Ch sp.+Bm*, *Fr+Bm*, *Sa+Bm*.

### Bioquímica:

De modo a descodificar a ação dos endófitos como potencial bioprotetor da planta contra *Biscogniauxia mediterranea*, decide-se proceder a análises transcriptómicas e metabolómicas de isolados do caule, visto estas duas ómicas serem particularmente relevantes no estudo de interações planta-endófito [14]. Utiliza-se o protocolo descrito em Chen X. *et al.* [14][15]. Começa-se com o corte do caule, macerando-o em tampão a frio. Depois, procede-se a uma centrifugação (20000 g por 6 min a 4°C) e aproveita-se o sobrenadante para o estudo dos metabolitos, e o pellet para o estudo dos transcritos. O sobrenadante é submetido a separação de fases com clorofórmio:água, separando os metabolitos polares dos não polares, e fazendo a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) (Fig. 4). O pellet é lavado com β-mercaptoethanol e solubilizado em sistema tampão com guanidina-HCl e uma combinação de detergentes Tween 20/Triton x 100. Depois, é feito o fracionamento diferencial de ácidos nucleicos em colunas à base de sílica, e aproveita-se o RNA que se sequencia em Illumina, procedendo-se depois à análise dos transcritos (Fig. 5).



**Fig. 4** - Representação esquemática do isolamento de células do caule (topo) e procedimento para análise dos metabolitos presentes nas células dos isolados do caule (baixo).



**Fig. 5** - Representação esquemática do procedimento para análise dos transcritos presentes nas células dos isolados do caule.

### Resultados esperados e conclusão:

Considerando os resultados obtidos para a ação de biocontrole dos fungos endófitos analisados, é expectável observar uma diferença fenotípica entre o controlo positivo (infecção com *Bm*, sem endófitos) e os grupos com endófito e *Bm*, em que se espera que os endófitos não permitam a propagação da doença. Tendo em conta que o aumento de tolerância à infecção por agentes patogénicos, conferida pelos endófitos é atribuída aos metabolitos secundários produzidos destes, é antecipado que a análise metabolómica apresente alterações

de metabolitos específicos revelando potenciais moléculas intervenientes no mecanismo de resistência. À semelhança da análise de metabolómica, a análise de transcriptómica poderá indicar alterações na expressão génica ocorridas em consequência das interações estabelecidas.

## Referências

- [1] - Cunha, J. M. B. (2016). *Study of the fungal endophytic community in Quercus suber L. populations* (p. 97) [Dissertação de mestrado em Biologia Molecular]. <http://repositorium.uminho.pt/bitstream/1822/45583/1/Jo%e3%a3o%20Miguel%20Barge%20Cunha.pdf>
- [2] - Nations, F. and A. O. of the U., Programme, U. N. E., Convention, M. A. P. B., & Bleu, P. (2019). State of Mediterranean Forests 2018. In *Google Books*. Food & Agriculture Org. [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=Tmy1DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&ots=r3cVrvO2Kx&sig=VF18QQugXcJ5VzRPr0nFHRj3GGg&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=Tmy1DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&ots=r3cVrvO2Kx&sig=VF18QQugXcJ5VzRPr0nFHRj3GGg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- [3]- A APCOR. *Anuário de Cortiça 2018/2019 da APCOR*; Associação Portuguesa de Cortiça: Santa Maria de Lamas, Portugal, 2019. [Google Scholar]
- [4] - Costa, D., Tavares, R. M., Baptista, P., & Lino-Neto, T. (2020). Cork Oak Endophytic Fungi as Potential Biocontrol Agents against *Biscogniauxia mediterranea* and *Diplodia corticola*. *Journal of Fungi*, 6(4), 287. <https://doi.org/10.3390/jof6040287>
- [5] - Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* 2020 18:11, 18(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412->
- [6] - Lindow, S.E., and Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4): 1875–1883.
- [7] - Chandra, H., Kumari, P., Prasad, R., Chandra Gupta, S., & Yadav, S. (2021). Antioxidant and antimicrobial activity displayed by a fungal endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Picrorhiza kurroa* from Garhwal Himalayas, India. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101955. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101955>
- [8] - Collinson, N. P., Mann, R. C., Giri, K., Malipatil, M., Kaur, J., Spangenberg, G., & Valenzuela, I. (2020). Novel bioassay to assess antibiotic effects of fungal endophytes on aphids. *PLOS ONE*, 15(2), e0228813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228813>
- [9] - Linaldeddu, B. T., Sirca, C., Spano, D., & Franceschini, A. (2009). Physiological responses of cork oak and holm oak to infection by fungal pathogens involved in oak decline. *Forest Pathology*, 39(4), 232–238. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00579.x>

- [10] - Kaushik, N., Díaz, C. E., Chhipa, H., Julio, L. F., Andrés, M. F., & González-Coloma, A. (2020). Chemical Composition of an Aphid Antifeedant Extract from an Endophytic Fungus, *Trichoderma* sp. EFI671. *Microorganisms*, 8(3), 420. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030420>
- [11] - Bamisile, B. S., Senyo Akutse, K., Dash, C. K., Qasim, M., Ramos Aguila, L. C., Ashraf, H. J., Huang, W., Hussain, M., Chen, S., & Wang, L. (2020). Effects of Seedling Age on Colonization Patterns of Citrus limon Plants by Endophytic Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae and Their Influence on Seedlings Growth. *Journal of Fungi*, 6(1), 29. <https://doi.org/10.3390/jof6010029>
- [12] - Henriques, J., Nóbrega, F., Sousa, E., & Lima, A. (2015). Morphological and genetic diversity of Biscogniauxia mediterranea associated to Quercus suber in the Mediterranean basin. *Revista de Ciências Agrárias*. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/10652>
- [13] - Capretti, P., & Battisti, A. (2007). Water stress and insect defoliation promote the colonization of Quercus cerris by the fungus Biscogniauxia mediterranea. *Forest Pathology*, 37(2), 129–135. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00489.x>
- [14] - Chen, X., Sun, M., Chong, S., Si, J., & Wu, L. (2022). Transcriptomic and Metabolomic Approaches Deepen Our Knowledge of Plant–Endophyte Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.700200>
- [15] - Valledor, L., Escandón, M., Meijón, M., Nukarinen, E., Cañal, M. J., & Weckwerth, W. (2014). A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNAs, small RNAs, and proteins from plants and microorganisms. *The Plant Journal*, 79(1), 173–180. <https://doi.org/10.1111/tpj.12546>