

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Isolamento, ensaios de germinabilidade de sementes e caracterização química preliminar de metabólitos secundários de *Preussia minima*, fungo endofítico de *Vellozia nanuzae*, planta endêmica da Serra do Cipó - MG

**Marcos Fontes Campos**

**Belo Horizonte**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**Marcos Fontes Campos**

Trabalho de Conclusão apresentado ao  
Curso de Pós-graduação em  
Microbiologia da Universidade Federal de  
Minas Gerais como requisito à obtenção  
do título Especialista

Aluno: Marcos Fontes Campos

Orientador: Dr. Prof. Aristóteles Góes Neto (UFMG)

Co-orientadora: Profa. Yumi Oki (UFMG)

**Belo Horizonte**

**2017**

Dedico este trabalho a minha família, a meu pai Marcos Silva Campos e a minha mãe Rosa Antônia Izidoro.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Marcos Silva Campos e Rosa Antônia Izidoro por acreditarem em mim e em minha capacidade por não ser o melhor, mas por dar o melhor de mim. Também agradeço a Isabella por ser importante na minha vida. Sempre ao meu lado, sempre com paciência, me incentivando e fazendo eu acreditar que posso alcançar os meus objetivos.

Agradeço ao meu orientador Aristóteles Góes Neto e a minha co-orientadora Yumi Oki por acreditar que eu era capaz, pela orientação, ensinamentos, palavras de incentivos, puxões de orelha, paciência e dedicação.

Agradeço a professora Jacqueline Aparecida Takahashi e seu grupo de pesquisa por permitir a utilização de seu laboratório, pela sua paciência e sua dedicação ao me ensinar novas técnicas para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Agradeço ao Departamento de Microbiologia da Universidade federal de Minas gerais pela oportunidade de adquirir conhecimento.

Agradeço também a todos que passaram pelo meu caminho e me ajudaram de alguma maneira.

**“ Através de nós, a vontade da natureza é feita”**

Udyr

## RESUMO

Os fungos endofíticos podem auxiliar na germinação de sementes de plantas através da produção de compostos do metabolismo secundário e enzimas. Neste trabalho objetivou-se avaliar: (a) a influência da *Preussia minima*, fungo endofítico, na germinação de sementes da *Vellozia nanuzae*, uma planta endêmica da Serra do Cipó, em diferentes temperaturas (15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 40°C); e (b) detectar a presença de alcaloides/compostos nitrogenados, triterpenoides, esteroides e flavonoides do micélio e meio de cultura de *Preussia minima*, através de cromatografia em camada delgada (CCD). O fungo endofítico *Preussia minima* aumentou a germinação de sementes de *Vellozia nanuzae* nas temperaturas de 20° e 25°C. O maior tempo de germinações ocorreu na menor temperatura (15°C) em que foi observado que a presença do fungo aumenta a taxa de germinação. Além disso, as sementes inoculadas com o fungo também apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa no tempo de germinação das sementes, mas somente na temperatura de 15°C. A caracterização química de metabólitos secundários de *Preussia minima* por cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença de três grupos distintos: (i) compostos nitrogenados ou alcaloides, (ii) esteroides e (iii) flavonoides. Serão realizados ensaios futuros com a finalidade de se testar os extratos brutos diretamente sobre as sementes da planta nas mesmas condições de temperatura onde foi verificado o aumento da taxa de germinação com as sementes inoculadas diretamente com o micélio fúngico.

**Palavras-chave:** *Vellozia nanuzae*, fungos endofíticos, *Preussia minima*, germinação de sementes, perfil de metabólitos secundários.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das quatro etapas sequenciais. Etapa I correspondente a cor verde, etapa II correspondente a cor amarela, etapa III correspondente a cor azul e a etapa IV correspondente a cor roxa.....16

Figura 2. Efeito do fungo endofítico *P. minima* na germinação de *Vellozia nanuzae* em solo natural sob condições de fotoperíodo 12h claro e 12h escuro. (A) Porcentagem da germinação; (B) Número de dias necessário para iniciar a germinação. sf = sementes não-inoculadas com o isolado fúngico. f = sementes inoculadas com o isolado fúngico.....24

Figura 3: Perfil da placa cromatográfica com revelador Dragendorff. A esquerda, a placa cromatográfica controle com iodo e a direita, a placa cromatográfica com o revelador Dragendorff mostrando a presença de uma mancha alaranjada (indicada pela seta) .....25

Figura 4: Perfil da placa cromatográfica com o revelador Liebermann-Burchard com incidência de UV de 365 nm. A esquerda, a placa cromatográfica controle com iodo e a direita, a placa cromatográfica com o revelador Liebermann-Burchard, indicando a coloração azul-esverdeado típica da presença de esteroides.....25

Figura 5: Perfil da placa cromatográfica com o revelador NP-PEG com incidência de UV 254nm. A esquerda, a placa cromatográfica controle com iodo e a direita, a placa cromatográfica com o revelador NP-PEG, mostrando o aumento da fluorescência e, conseqüentemente a presença de flavonoides.....26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização fitoquímica do extrato bruto (sobrenadante + micélio) de *Preussia minima*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	13
3 METODOLOGIA.....	14
4 RESULTADOS.....	22
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES.....	30
7 REFERÊNCIAS.....	31

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são considerados importantes mediadores da estrutura e dinâmica da comunidade vegetal (Rudgers et al. 2004). Eles podem propiciar inúmeros benefícios como melhoria no desenvolvimento (Khan et al., 2009; Fernandes, 2016) e sobrevivência das plantas hospedeiras em que ocorrem (Briske, 1996; Khan et al., 2009; Fernandes, 2016).

Há evidências que algumas espécies de endofíticos podem melhorar o desenvolvimento de seus hospedeiros. A colonização por dois fungos endofíticos negros septados (“dark septate endophyte”) *Scytalidium vaccinii* e *Meliniomyces vraolstadiae* em raízes de *Pinus sylvestris* induziu a um aumento da biomassa e concentrações de nitrogênio da planta (Jumpponen, 2001; Alberton et al., 2010). Além disso, na gramínea perene *Lolium* sp., o fungo endofítico *Acremonium loliae* propiciou um aumento do tamanho das folhas, ramos e raízes, e, conseqüentemente, da biomassa vegetal (Latch et al. 1985).

Alguns trabalhos sugerem que esta melhoria no desenvolvimento vegetal esteja relacionado com a produção de enzimas, fitohormônios e outros compostos do metabolismo secundário. Na gramínea *Elymus mollis*, fungos endofíticos da espécie *Gliomastix murorum* produziram hormônios vegetais como a giberelina (Khan et al. 2009a). Este hormônio é um diterpeno conhecido por estimular o crescimento e o alongamento dos ramos, germinação e florescimento (Prins et al., 2010). Em *Annona squamosa* L., um tipo de pinha, os fungos endofíticos isolados promoveram o crescimento vegetal através de sua atividade lipolítica (De Oliveira Silva, 2006). Além disso, em *Embothrium coccineum*, uma arvoreta encontrada na América do Sul (Chile), evidenciou-se uma correlação estatisticamente positiva entre frequência de fungos endofíticos foliares e proteção da planta, avaliada pelo percentual de danos causados por herbivoria ou lesões provocadas por patógenos (Gonzalez-Teuber, 2016).

A diversidade de espécies de fungos endofíticos varia com a espécie da planta hospedeira, seus diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento, bem como do substrato em que ocorrem e fatores climáticos, e, em geral, há uma ampla diversidade

desses endófitos em regiões tropicais (Oki, 2009). Os campos rupestres são ambientes frágeis com solos pobres e ácidos que se destacam por apresentar alto endemismo e a presença de muitas espécies raras e ameaçadas de extinção (Mendonça & Lins 2000). São considerados importantes centros de endemismo da flora neotropical (Coser, 2008) e áreas prioritárias para conservação pelo Ministério do Meio Ambiente (Giulietti *et al.*, 2005). Áreas de campo rupestre tem sofrido severos impactos ambientais devido a devastação, mineração e urbanização (Rohden, 2010). A vegetação de campo rupestre pode ser encontrada nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste, em solos rasos ou afloramentos rochosos. Sua flora é adaptada às variações climáticas rigorosas como a alta temperatura com grande incidência de raios solares (principalmente UV) e falta de água por grandes períodos. As chuvas provocam enxurradas, causando, por pequenos períodos, um excesso hídrico no substrato. As características locais como a alta inclinação do terreno, afloramentos rochosos e alta altitude promovem o aumento da amplitude térmica durante o dia e na maior parte das estações do ano (Oliveira-Filho & Fluminhan-Filho, 2000; Rodrigues, 2010).

O estudo de fungos endofíticos em campos rupestres é recente até o presente momento apenas sete trabalhos foram publicados (Oki *et al.* 2008 , 2009; Pagano and Scotti 2009 ; Vaz *et al.* 2009; De Carvalho *et al.* 2012 ; Vieira *et al.* 2014 ; Coutinho *et al.* 2015). Um total de 51 prováveis espécies já foram isolados e identificados em distintas plantas em campos rupestres. A grande maioria das espécies corresponde a fungos filamentosos do Filo Ascomycota que foram isolados a partir de tecidos sadios de 20 espécies distintas de plantas típicas do ambiente de campos rupestres, das famílias Asteraceae, Orchidaceae e Velloziaceae (Oki *et al.*, 2016).

Velloziaceae apresenta a maior parte de sua diversidade e o alto endemismo nos campos rupestres especialmente nas formações quartizíticas em altitudes de 900 a 2000 metros da Cadeia do Espinhaço (Garcia *et al.*, 2007; Lousada *et al.*, 2013). Esta família é praticamente anfiatlântica e relativamente pequena (Alves *et al.*, 2014), com sua distribuição tropical, sul americana, tendo Brasil como o centro de sua dispersão (Garcia *et al.*, 2007). Até o presente momento, a única espécie de Velloziaceae de campos rupestres que se há conhecimento sobre a diversidade de

fungos endofíticos é a espécie *Vellozia graminea* na qual foram registrados um total de 282 fungos endofíticos (Santiago 2008).

Entre as espécies endêmicas e de grande relevância para o campo rupestre encontra-se *Vellozia nanuzae*. Esta espécie foi descoberta em 1974 e se caracteriza por pequeno porte (até 30cm), exalando odor similar a tutifruiti e por ser encontrada apenas em fendas rochosas do campo rupestre da cadeia do Espinhaço (de Mello-Silva, 1991). Quimicamente nesta espécie foram identificadas inclusive dois novos diterpenos (Pinto et al., 1988) e 12 flavonoides (Harborne et al., 1993). Apesar de 42 anos após a sua descoberta, pouco se sabe sobre a sua biologia, seu desenvolvimento e sua interação com a comunidade de fungos endofíticos. Estudos ainda em andamento demonstraram a existência de 49 morfoespécies de fungos endofíticos, os quais podem auxiliar no desenvolvimento dessa importante espécie vegetal endêmica. Uma espécie de fungo endofítico, a *Preussia minima*, foi identificado como a mais frequente dos isolados em cultivo de tecido foliar das plantas amostradas. Devido a sua alta abundância relativa, hipotetiza-se se a presença desse fungo e de seus metabólitos aumentam a germinação de sementes de *Vellozia nanuzae*. Portanto, é de grande relevância estudar a possibilidade de utilização do fungo endofítico *Preussia mínima* para aumentar a germinabilidade de uma espécie vegetal endêmica (*Vellozia nanuzae*), ameaçada de extinção em um ambiente restrito.

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo compreendeu os seguintes objetivos:

- Avaliar a influência da *Preussia minima* na germinação de sementes da *Vellozia nanuzae* em diferentes temperaturas;
- Detectar qualitativamente se metabólitos secundários das classes dos alcaloides, triterpenoides, esteroides e flavonoides são produzidos pela *Preussia minima*, através de cromatografia em camada delgada (CCD).

### 3 METODOLOGIA

A metodologia do presente estudo consistiu em quatro etapas sequenciais: (i) a coleta dos indivíduos de *Vellozia nanuzae* em campo, (ii) o isolamento, purificação e identificação dos fungos endofíticos das folhas de *V. nanuzae*, (iii) os ensaios de germinação de sementes de *V. nanuzae* com o fungo endofítico mais abundante, *Preussia minima* e (iv) a caracterização química de classes de metabólitos secundários de *Preussia minima* por cromatografia em camada delgada (Fig. 1), descritas detalhadamente a seguir:

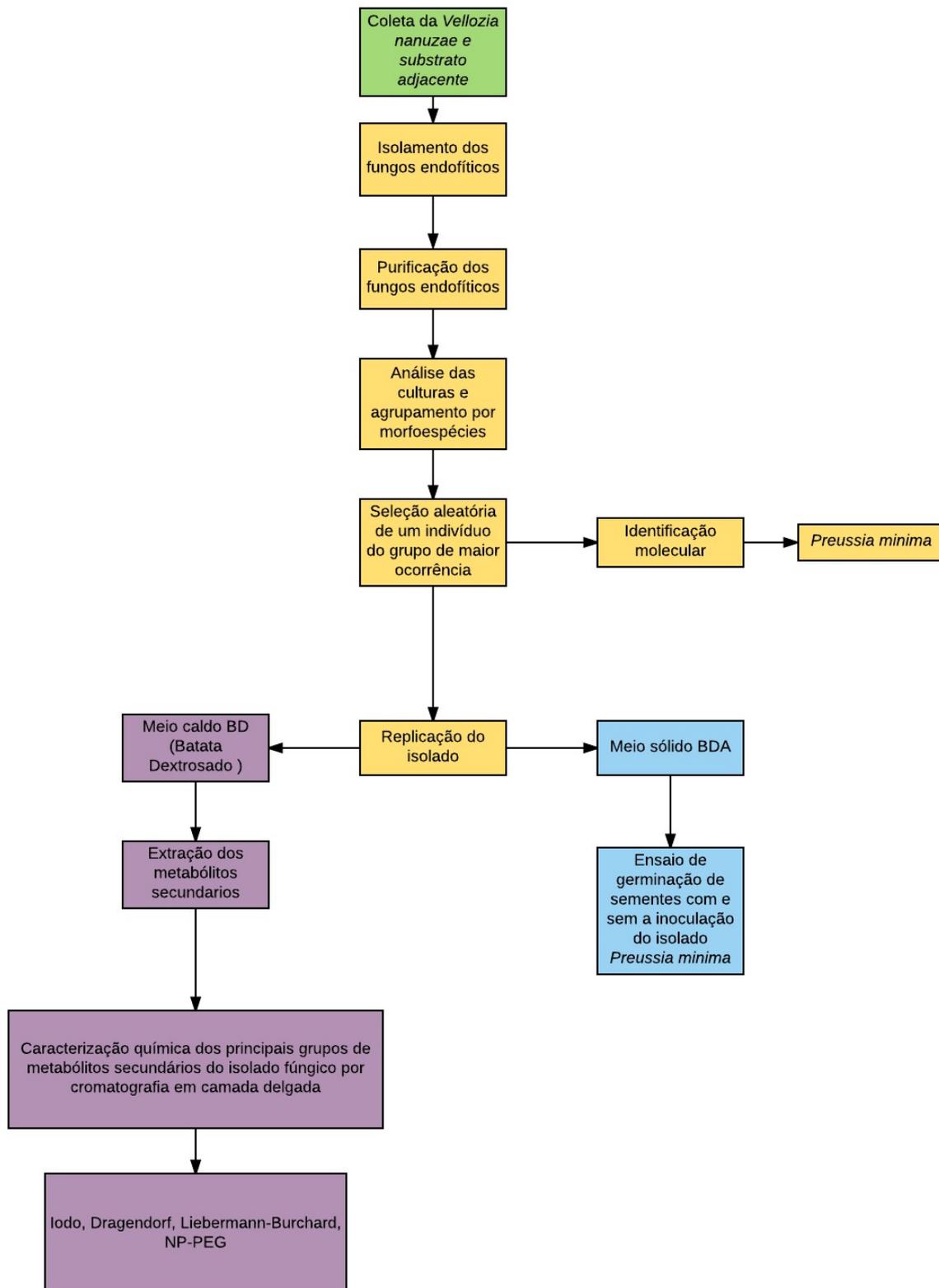


Figura 1. Fluxograma das quatro etapas sequenciais. Etapa I correspondente a cor verde, etapa II correspondente a cor amarela, etapa III correspondente a cor azul e a etapa IV correspondente a cor roxa.

### 3.1 Coleta das plantas (*Vellozia nanuzae*) e solo adjacente

As coletas dos indivíduos de *Vellozia nanuzae* foram realizadas na Serra do Cipó, na Reserva Particular Vellozia (19°16'54" S ; 43°35'45" W), na rodovia MG-010, Km 108, Santana do Riacho, Minas Gerais, Brasil, ao longo de 2 anos, trimestralmente. Ao todo, 960 indivíduos de *V. nanuzae* foram examinados durante o período de trabalho, sendo 15 indivíduos de cada sítio de coleta, 4 sítios de coleta por gradiente, 2 gradientes altitudinais (1.000 e 1.100 m) em 8 trimestres (4 estações secas e 4 chuvosas). De cada indivíduo foram selecionadas cinco folhas maduras, recém- expandidas e sem herbivoria.

Os critérios de seleção das plantas foram: (1) quantidade de ramos, onde cada ramo deveria ter, no mínimo, três folhas; (2) aspecto de suas folhas (quantidade, tamanho, cores mais verdes); (3) ausência de sinais de predação. Após a escolha de cada indivíduo, três ramos foram retirados e acondicionados no mesmo saco de papel Kraft devidamente identificado por indivíduo e altitude. Os frutos contendo as sementes de cada indivíduo também foram coletados e acondicionados em um outro saco de papel. Esse processo se repetiu nos dois pontos de coleta até completar quinze indivíduos cada, os quais foram embalados em sacos plásticos transparentes separados por região e posteriormente lacrados para o transporte até o laboratório. Os frutos secos contendo as sementes para os ensaios de germinação foram coletados somente na última excursão de coleta das oito que foram realizadas.

O substrato rochoso próximo ao local dos indivíduos vegetais foi coletada utilizando uma pá de mão para jardinagem e acondicionada em dois sacos plásticos transparentes de dimensão 40 x 60 cm e posteriormente identificados.

As plantas, os frutos secos com as sementes e as amostras de solo foram acomodadas e transportadas para o Laboratório de Ecologia Evolutiva e Biodiversidade (LEEB) – UFMG. As plantas e os frutos com as sementes foram conservados sob refrigeração (4-10°C) As amostras de substrato foram embaladas e levada à estufa para secar e posteriormente peneiradas (malha de 2 x 2 mm) para o ensaios de germinação.

### 3.2 Isolamento e purificação de fungos endofíticos das folhas de *Vellozia nanuzae*

Para o isolamento dos fungos endofíticos das folhas de *Vellozia nanuzae*, cada indivíduo passou por uma triagem. A capela foi esterilizada com álcool 70% e luz ultravioleta (UV) durante 20 minutos. Pinças e alças de platina foram aquecidas no fogo do bico de Bunsen imediatamente antes de sua utilização no processo de inoculação das folhas em meio de cultura sólido de Batata, Dextrose e Ágar (BDA) com cloranfenicol. Foi retirado e selecionado de cada saco de papel um ramo e, deste ramo, três folhas. Estas folhas foram colocadas em um circuito com 5 placas de petri contendo álcool 70% (1 min.) hipoclorito de sódio 2% (1 min.), álcool 70% (30 seg), água destilada (30 seg.) e água destilada (30 seg.), respectivamente, para desinfecção superficial. Essas folhas ficavam submersas nos líquidos de cada placa de Petri por um tempo determinado em cada líquido. Uma das três folhas foi retirada da água e colocada em uma placa de Petri esterilizada e vazia, e então cortada em oito pedaços. Através do uso de uma pinça, os oito pedaços foram colocados no meio de cultura BDA dispostos em círculo em cada placa de Petri. Após a inoculação das folhas cortadas, a placa de Petri foi identificada em sua borda por indivíduo (letra V referente a *Vellozia nanuzae*), ramo (Letra R) e folha (Letra F) (Vx Rx Fx, sendo x o número de identificação) e vedada com o uso de plástico filme para evitar que a placa se abra e contaminasse durante os processos seguintes. Este processo de inoculação se repetiu com todos os indivíduos totalizando 270 placas de Petri. Os indivíduos do sítio de coleta com menor altitude foram identificados de V1 R1 F1 até V15 R3 F3 e os indivíduos do sítio de coleta com maior altitude foram identificados de V16 R1 F1 até V30 R3 F3.

As placas foram vedadas com parafilme e colocadas em sacos plásticos e guardadas em estufa. Durante um mês, a cada 7 dias, estas placas foram analisadas para a verificação de crescimento fúngico. Para cada coleta, uma planilha foi criada para um controle das amostras, contendo as seguintes informações: data da coleta, área de coleta, espécie, altitude, indivíduo, ramo, folha, etiqueta da placa, indivíduo, número de fragmentos foliares, números de fungos endofíticos, número de morfoespécies, observações, data de emergência do fungo endofítico na folha,

características gerais de cada fungo isolado, data de repique, data da foto, foto frente, foto verso.

Os fungos foram analisados, marcados ao fundo da placa, com círculos e letras, e posteriormente isolados em placas de Petri em meio de cultura BDA com cloranfenicol. As placas foram seladas com plástico filme, identificadas e guardadas. Este processo se repetiu com as placas-mãe até o isolamento de todos os fungos. Com as culturas isoladas prontas, uma análise morfológica foi feita e os fungos foram agrupados em morfoespécies e posteriormente utilizados para identificação molecular (nrITS). As colônias isoladas foram repicadas em placas de Petri em meio BDA sólido para realizar análises químicas, o mesmo foi cultivado em meio líquido BDA. Após 1 mês de cultivo este fungo, identificado como *Preussia minima* (Ascomycota, Pezzizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporales, Sporormiaceae) foi repicado para mais quatro balões de Erlenmeyer e mantidos em câmara incubadora para demanda bioquímica do oxigênio a uma temperatura 20°C e com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro.

### **3.3 Ensaio de germinação de sementes com e sem a inoculação do isolado de *Preussia minima***

Os experimentos de germinação foram realizados com e sem a presença do fungo endofítico *Preussia minima* em diferentes temperaturas (15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 40°C) e em substrato natural de ocorrência, em fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro. Inicialmente, as sementes foram esterilizadas superficialmente em placas de Petri com álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 6% (2 min), álcool 70% (1 min), água destilada (3X) (1 min). Posteriormente, 900 sementes receberam inoculação do fungo e 900 sementes não receberam (controle). A inoculação das sementes foi realizada com a introdução da biomassa micelial em placa de Petri com água destilada esterilizada por 30 min.

Para os ensaios de germinação foram analisados um total de 1800 sementes, das quais 900 sem inoculação (grupo controle) e 900 com inoculação do isolado

fúngico selecionado de *Preussia minima* (grupo experimental). As sementes previamente inoculadas (grupo experimental) ou não (grupo controle) foram inseridas em potes de plástico de 10 x 15 cm com 2,5 cm de substrato coletado não-estéril, contendo uma tela na sua parte superior. Em cada temperatura, foram utilizadas 6 potes (n = 36 potes), contendo cada um 25 sementes. Diariamente, ao longo de 30 dias, os potes eram regados com água destilada esterilizada e fazia-se a verificação e registro do número de sementes germinadas, as quais eram retiradas e colocadas em uma placa de Petri com papel-filtro esterilizado e umedecido diariamente com água destilada esterilizada. Foram então calculadas as seguintes variáveis: (i) tempo necessário para o início da germinação (em dias), (ii) taxa de germinação (em porcentagem de sementes germinadas em 30 dias).

A normalidade dos dados de porcentagem de germinação e tempo de germinação foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram parametrizados para avaliar a influência da presença ou não do fungo em diferentes temperaturas na porcentagem e para o tempo de germinação utilizou-se ANOVA, e para comparações, o teste de Student-Newman-Keuls, através do Programa SigmaStat for Windows Version 2.03 (Copyright© 1992-1997 SPSS Inc.). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ .

### **3.4 Caracterização química dos principais grupos de metabólitos secundários de *Preussia minima* por cromatografia em camada delgada (CCD)**

A caracterização química qualitativa dos principais grupos de metabólitos secundários do isolado fúngico selecionado de *Preussia minima* que foi utilizado nos ensaios de germinação, foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) em quatro placas cromatográficas distintas. Uma das placas cromatográficas foi utilizada como um padrão para avaliar a eluição da amostra usando o iodo misturado com a fase móvel como revelador.

O isolado fúngico de *Preussia minima* foi crescido em meio BD (ágar batata dextrosado) líquido em quatro Erlenmeyers (500 mL) sem agitação, por 30 dias. Após

esse período, foi adicionado 250 mL de acetato de etila à cultura líquida (biomassa micelial + sobrenadante) e, em seguida, o material foi filtrado, em funil Büchner com filtro de papel, utilizando uma bomba de vácuo para a separação da biomassa micelial e do sobrenadante.

Para a extração dos metabólitos secundários não-secretados (que estavam no interior das hifas), a biomassa micelial foi retirada do filtro de papel, colocada em um erlenmeyer e adicionado 100 mL de acetato de etila para o rompimento das paredes e membranas das hifas constituintes da biomassa micelial por um equipamento emissor de ultrassons. Posteriormente, o sobrenadante desse tratamento é misturado com o sobrenadante original da cultura líquida de modo que, em um mesmo recipiente, em teoria, há a presença tanto dos metabólitos secundários secretados como não-secretados pelo isolado fúngico. Essa mistura foi então vertida em um funil de decantação, adicionado aproximadamente 100 mL de acetato de etila, homogeneizada por agitação, para a separação das fases da mistura. A fase líquida mais densa (acetato de etila), a qual fica na parte inferior do funil foi então vertida em um balão de fundo arredondado. Esse processo foi repetido 5 vezes para a separação completa da fase de acetato de etila contendo os metabólitos secundários do isolado fúngico dissolvidos nessa fase. Para a completa evaporação do solvente (acetato de etila) e a obtenção do extrato bruto, utilizou-se um rotaevaporador.

O extrato bruto foi então acondicionado em frasco escuro e aberto para secagem completa em temperatura ambiente, que durou um período de três dias. Esse extrato bruto seco, contendo os metabólitos secundários secretados e não-secretados do isolado de *Preussia minima* foi utilizado para a caracterização química dos principais grupos de metabólitos secundários de fungos por cromatografia em camada delgada.

A solubilização do extrato foi realizada com a adição de 10 gotas de clorofórmio e 20 gotas de acetato de etila. Posteriormente, utilizando um capilar de vidro, o extrato bruto já solubilizado foi adicionado (em três pontos próximos) na base (a 1 cm de altura) de placas cromatográficas de sílica 60G (lâmina de alumínio revestida por material adsorvente: sílica-gel). As placas cromatográficas (quatro ao total) foram colocadas em uma cuba cromatográfica de vidro vertical, contendo uma mistura de 7 mL de hexano e 3 mL de acetato de etila como eluente (fase móvel), além de um filtro

de papel aderido à parede da cuba para facilitar a saturação com o vapor da mistura de solventes. O sistema foi então fechado para a realização do processo de cromatografia em camada delgada. A amostra então é eluída pelo solvente (hexano + acetato de etila). A fase sólida estacionária correspondeu à sílica-gel e a fase líquida móvel correspondendo ao solvente + a solução contendo o extrato bruto. Durante esse processo os componentes da amostra são separados na sílica devido ao processo de eluição pelo solvente. As substâncias com maior afinidade química (no caso, polaridade) ao solvente são arrastadas com maior velocidade. A presença de várias substâncias resultará em comportamentos diferentes durante a eluição dependendo dos grupos funcionais em suas estruturas. As quatro placas cromatográficas foram retiradas antes do solvente atingir a sua extremidade e secas à temperatura ambiente para a evaporação completa dos solventes.

Três placas cromatográficas foram utilizadas para a identificação de diferentes classes de metabólitos secundários utilizando reagentes específicos enquanto que uma placa cromatográfica foi utilizada como um padrão. Esta primeira placa cromatográfica serviu como um padrão, utilizada apenas para avaliar a eluição da amostra utilizando como revelador o iodo (até que o arraste das amostras ficasse visível na placa dentro da cuba). A segunda placa cromatográfica foi utilizada para a revelação de compostos nitrogenados e alcaloides. A segunda placa cromatográfica é acondicionada verticalmente em uma capela e é borrifada, utilizando um borrifador de ar pressurizado, com o reagente Dragendorff (2,6 g carbonato de bismuto, 7,0 g iodeto de sódio e 25 mL ácido acético glacial). A presença de compostos nitrogenados ou alcaloides na amostra é revelada pela coloração alaranjada ou vermelho tijolo. O mesmo procedimento utilizando borrifamento de um reagente específico foi utilizado para a terceira e quarta placas cromatográficas. No caso da terceira placa cromatográfica, utilizou-se o reagente Liebermann-Burchard (5 mL anidrido acético, 5 mL ácido sulfúrico concentrado (98% p/v) e 50 mL etanol absoluto). Após o borrifamento desse reagente, a terceira placa cromatográfica foi aquecida em placa térmica. Após essa reação ser submetida a luz ultravioleta de 254 nm e 365 nm, o aparecimento de uma coloração rosa indica a presença e azul-esverdeada para triterpenos pentacíclicos e esteroides, respectivamente. A quarta placa cromatográfica foi borrifada com dois reagentes: inicialmente é aplicado o NP (difenilboriloxetilamina 1 % em metanol), seguido de PEG (polietilenoglicol 4000 a 5% em etanol) e deixada em

repouso por 10 min. Após a exposição a luz UV de 254 nm, o aumento da fluorescência das manchas evidencia a presença de flavonoides.

## 4 RESULTADOS

Durante o período de estudo foram isolados 2.664 fungos de 49 morfotaxons provenientes de 48.000 fragmentos das 4.800 folhas coletadas de 960 indivíduos de *V. nanuzae* nas áreas da Serra do Cipó. O fungo endofítico, identificado molecularmente como *Preussia minima* (Auersw.) Arx (Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Sporormiaceae) foi a espécie com maior frequência de ocorrência, tendo sido isolado a partir de aproximadamente 70% dos indivíduos coletados. Portanto, foi a espécie selecionada para os ensaios de germinação com sementes de *Vellozia nanuzae*.

A temperatura afetou a germinação de *V. nanuzae* ( $p < 0,01$ ) assim como o tratamento (com ou sem fungo) ( $p < 0,01$ ) (Figura 2 A e B). A maior taxa de germinação foi observada nas temperaturas de 30-35°C (70-80%) e a menor taxa de germinação ocorreu na temperatura de 40 °C (12-16%). Nas temperatura de 15, 30, 35 e 40 °C não houve diferença entre os tratamentos com e sem o isolado de fungo endofítico.

As sementes com fungo tiveram maior taxa de germinação quando comparadas com as sem fungo nas temperaturas de 20°C (Porcentagem média da germinação com fungo  $\pm$  erro padrão = 67% $\pm$ 5,3 e Porcentagem média da germinação com fungo  $\pm$  erro padrão = 58%  $\pm$  6,5) e 25°C (Porcentagem média da germinação com fungo  $\pm$  erro padrão = 71%  $\pm$  5,3 e Porcentagem média da germinação com fungo  $\pm$  erro padrão = 59%  $\pm$  1,3).

O maior tempo de germinação foi observado na temperatura de 15°C. A presença do fungo endofítico diminuiu o tempo de germinação somente na temperatura de 15 °C (Média tempo de germinação com fungo  $\pm$  erro padrão = 5,3  $\pm$

2,4 dias Média do tempo de germinação sem fungo  $\pm$  erro padrão =  $9,7 \pm 2,4$  dias;  $p=0,01$ ; Figura 2 A e B).

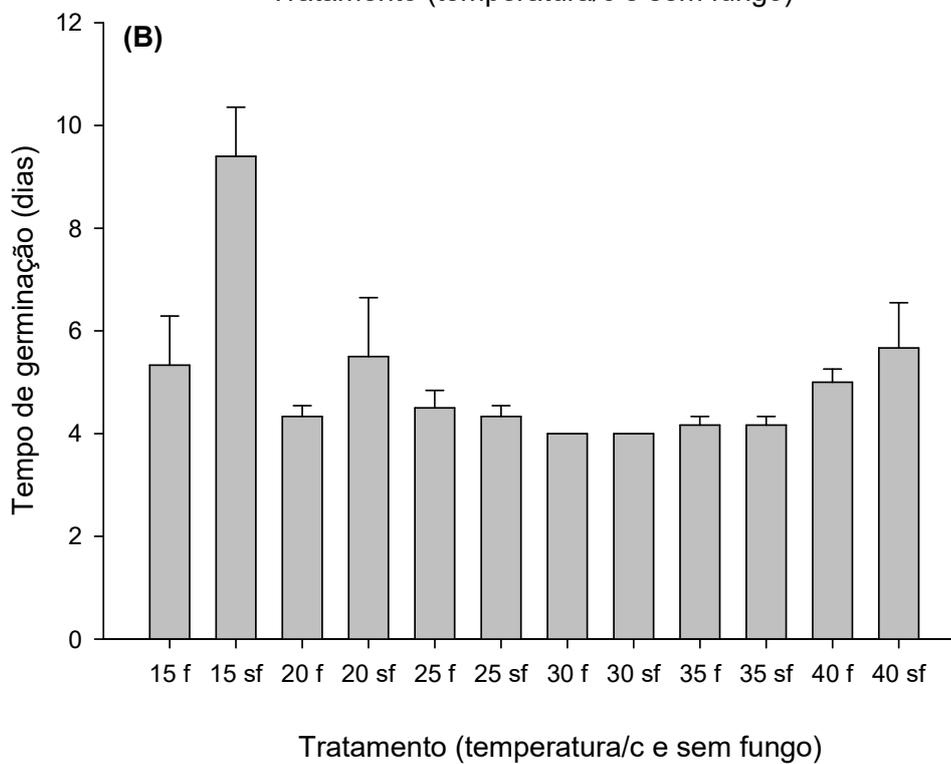
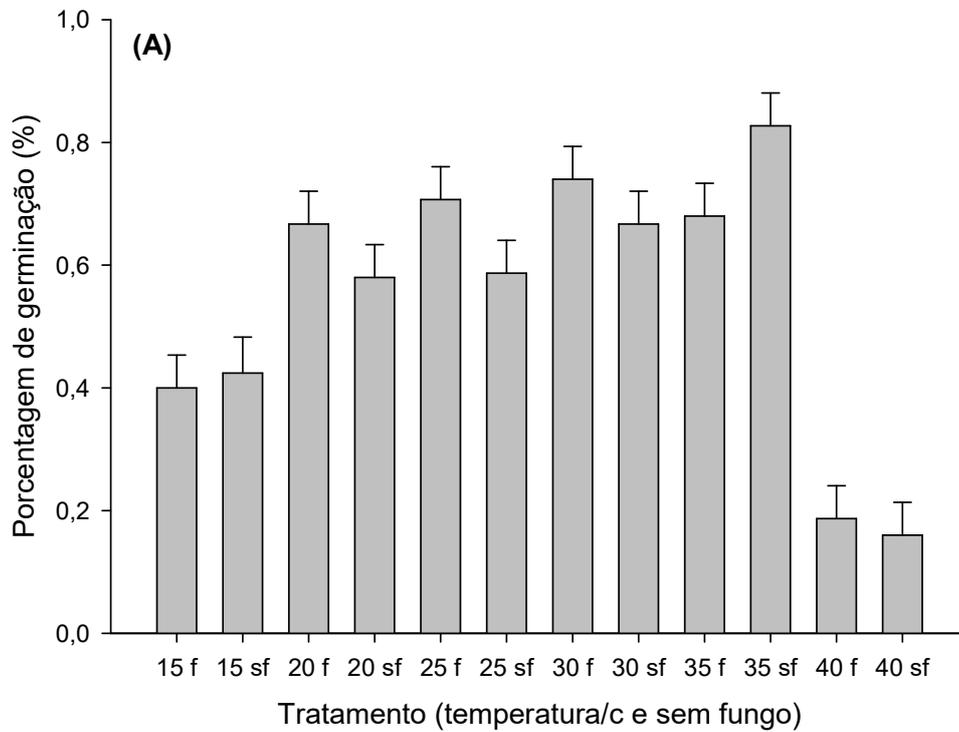


Figura 2. Efeito do fungo endofítico *P. minima* na germinação de *Vellozia nanuzae* em solo natural sob condições de fotoperíodo 12h claro e 12h escuro. (A) Porcentagem da germinação; (B) Número de dias necessário para iniciar a germinação. sf = sementes não-inoculadas com o isolado fúngico. f = sementes inoculadas com o isolado fúngico.

A tabela 1 mostra os resultados da triagem química do extrato bruto do sobrenadante e micélio do isolado fúngico de *Preussia minima*

Tabela 1: Caracterização fitoquímica do extrato bruto (sobrenadante + micélio) de *Preussia minima*

Grupos de metabólitos secundários	Extrato bruto de <i>Preussia minima</i>
compostos nitrogenados ou alcaloides	+
triterpenos pentacíclicos	-
esteroides	+
flavonoides	+

A avaliação dos perfis de CCD em placas cromatográficas de gel de sílica revelou a presença de compostos nitrogenados ou alcaloides (Fig. 3), esteroides (Fig. 4) e flavonoides (Fig. 5), mas não de triterpenos pentacíclicos. A eluição utilizando como revelador o iodo ocorreu de forma esperada, confirmando que o sistema montado para a CCD em gel de sílica, com a fase móvel utilizada, é adequado para a realização da caracterização química qualitativa. Foram avaliados então a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: (i) compostos nitrogenados ou alcaloides, (ii) triterpenos pentacíclicos e esteroides e (iii) flavonoides.

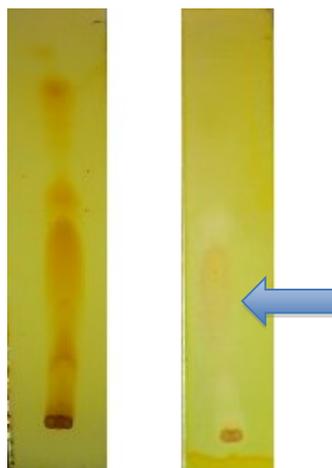


Figura 3: Perfil da placa cromatográfica com revelador Dragendorff. A esquerda, a placa cromatográfica controle com iodo e a direita, a placa cromatográfica com o revelador Dragendorff mostrando a presença de uma mancha alaranjada (indicada pela seta).

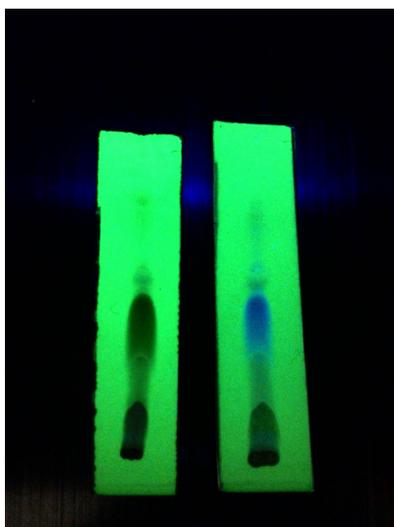


Figura 4: Perfil da placa cromatográfica com o revelador Liebermann-Burchard com incidência de UV 365nm. A esquerda a placa cromatográfica controle com iodo e a direita placa cromatográfica com o revelador Liebermann-Burchard, indicando a coloração azul-esverdeado típica da presença de esteroides.

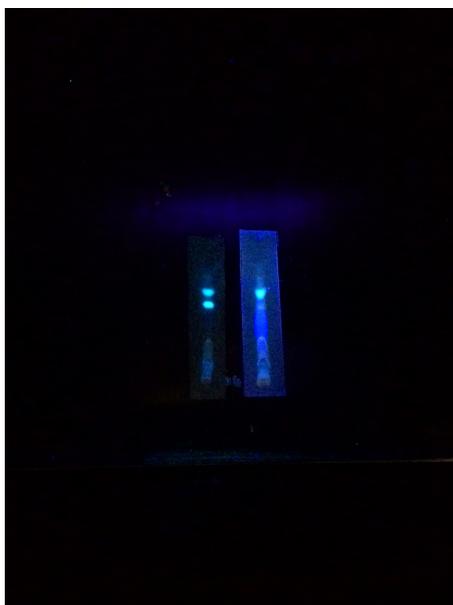


Figura 5: Perfil da placa cromatográfica com revelador NP-PEG com incidência de UV 254nm. A esquerda, a placa cromatográfica controle com iodo e a direita, a placa cromatográfica com o revelador NP-PEG, mostrando o aumento da fluorescência e, conseqüentemente a presença de flavonoides.

## 5 DISCUSSÃO

A presença do fungo endofítico *Preussia minima* não influenciou negativamente a germinação da *Vellozia nanuzae*, observando-se a melhoria da germinação nas temperaturas de 20°C e 25°C. Alguns estudos também relatam o aumento da taxa de germinação de sementes em diferentes plantas quando inoculadas com diferentes fungos endofíticos, similarmente ao encontrado no presente estudo. Clay (1987) relatou que sementes da planta *Lolium perene* inoculadas com o fungo *Acremonium loliae* e da planta *Festuca arundinacea* inoculadas com o fungo *Acremonium coenophialum* apresentaram uma maior taxa de germinação (aprox. 10% maior entre 20°-24°C, em regime de luz 14h claro - 10h escuro) do que a encontrada em sementes não-inoculadas com respectivos fungos. O aumento da taxa de germinação e as temperaturas utilizadas foram semelhantes ao nosso estudo. Hubard et al. (2012) investigaram a influência da inoculação de determinadas linhagens de fungos endofíticos (mas sem identificá-las) na taxa de germinação de sementes de uma determinada espécie de trigo (*Triticum turgidum*), mas em condições estressantes de alta temperatura e seca. As sementes de trigo inoculadas com duas das linhagens de fungos endofíticos apresentaram uma maior taxa de germinação do que sementes não-inoculadas à temperatura de 36°C, entretanto as demais sementes inoculadas com outros linhagens não apresentaram esse aumento na taxa de germinação. Em nosso trabalho, foram testadas também a germinação de sementes inoculadas em altas temperaturas (35° e 40 °C) e, assim como a maior parte das linhagens testadas por Hubard et al. (2012), não houve, para essas altas temperaturas, um incremento da germinação das sementes de *Vellozia nanuzae*.

A germinação de sementes de plantas pode ser auxiliada por fungos endofíticos quando esses produzem compostos do metabolismo secundário ou enzimas que irão atuar como facilitadores em alguma das etapas desse processo biológico. Em nosso estudo, o fungo utilizado produziu alcaloides, esteroides e flavonoides. Extratos brutos e etanólicos de *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Monascus ruber* e *Penicillium citrinum*, isolados de caule de bambu aumentaram a taxa de germinação de sementes de arroz em diferentes períodos de incubação (1, 3 e 5 dias) em um percentual comparável ao do fitormônio comercial

(ácido giberélico) (Paglia & Valentino, 2016). Embora no nosso estudo, não foram testados os extratos brutos do isolado de *Preussia minima* diretamente sobre as sementes, constatou-se a ocorrência de grupos de compostos químicos do metabolismo secundário que podem potencialmente aumentar a germinabilidade de sementes de *Vellozia nanuzae*. Ensaios futuros com a finalidade de se testar os extratos brutos diretamente sobre as sementes da planta nas mesmas condições de temperatura onde foi verificado o aumento da taxa de germinação com as sementes inoculadas diretamente com o micélio fúngico serão necessários para corroborar essa hipótese.

Além dos compostos de metabolismo secundário, enzimas produzidas por fungos endofíticos que degradem compostos de reserva energética (por ex. determinados carboidratos e lipídios) das sementes de plantas também podem aumentar a taxa de germinação de sementes. A principal enzima produzida pelo fungo *Preussia minima*, isolado de uma planta nativa australiana (*Eremophila longifolia*) em meios de cultura indutores de hidrolases é uma alfa-amilase (Zaferanloo et al., 2014). O amido é o principal carboidrato de reserva de sementes de plantas e a enzima alfa-amilase é uma das principais enzimas que degradam amido e, portanto, fundamental durante a mobilização das reservas energéticas da semente durante a fase da germinação denominada ativação do metabolismo. Apesar de não haver nenhum estudo sobre a caracterização de compostos de reserva em sementes de *Vellozia nanuzae*, é muito provável que elas apresentem amido como carboidrato de reserva. Portanto, a alta produção de alfa-amilase por *Preussia minima* auxiliaria decisivamente na germinação das sementes de *Vellozia nanuzae*. Entretanto, para a confirmação dessa hipótese, são necessários estudos posteriores de caracterização dos compostos de reserva das sementes de *Vellozia nanuzae* e a detecção e quantificação de alfa-amilases no isolado de *Preussia minima* estudado.

## 6 CONCLUSÕES

- *Preussia minima* aumentou a taxa de germinação de sementes de *Vellozia nanuzae* sob diferentes condições de temperatura;
- A presença de compostos nitrogenados ou alcaloides, esteroides e flavonoides foram detectados em *Preussia minima*.

## 7 REFERÊNCIAS

ALBERTON, Odair; KUYPER, Thomas W.; SUMMERBELL, Richard C. Dark septate root endophytic fungi increase growth of Scots pine seedlings under elevated CO<sub>2</sub> through enhanced nitrogen use efficiency. **Plant and Soil**, v. 328, n. 1-2, p. 459-470, 2010.

BRISKE, D. D. Strategies of plant survival in grazed systems: a functional interpretation. **The ecology and management of grazing systems**. CAB International, Wallingford, p. 37-67, 1996.

CLAY, Keith. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia**, v. 73, n. 3, p. 358-362, 1987.

COSER, Thiago dos Santos et al. Bromeliaceae Juss. dos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: florística e aspectos fenológicos. 2008.

COUTINHO, Etiene Silva et al. Variation of arbuscular mycorrhizal fungal communities along an altitudinal gradient in rupestrian grasslands in Brazil. **Mycorrhiza**, v. 25, n. 8, p. 627-638, 2015.

DE CARVALHO, Fernanda et al. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 52, p. 9-19, 2012.

DE MELLO-SILVA, Renato. The infra-familial taxonomic circumscription of the Velloziaceae: a historical and critical analysis. **Taxon**, p. 45-51, 1991.

DE OLIVEIRA SILVA, Roberta Lane et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta bot. bras**, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

FERNANDES, Geraldo Wilson (Ed.). **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**. Springer, 2016.

GARCIA, Queila de Souza; JACOBI, Claudia Maria; RIBEIRO, Beatriz de Aquino. Germination response of two species of *Vellozia* (Velloziaceae) from the "campos

rupestres" of Minas Gerais, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 451-456, 2007.

GIULIETTI<sup>1</sup>, ANA MARIA et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. 2005.

GONZÁLEZ-TEUBER, Marcia. The defensive role of foliar endophytic fungi for a South American tree. **AoB Plants**, v. 8, p. plw050, 2016.

HARBORNE, Jeffrey B. et al. Ten isoprenylated and C-methylated flavonoids from the leaves of three *Vellozia* species. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 219-226, 1993.

HUBBARD, Michelle; GERMIDA, James; VUJANOVIC, Vladimir. Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress. **Botany**, v. 90, n. 2, p. 137-149, 2012.

JUMPPONEN, Ari. Dark septate endophytes—are they mycorrhizal?. **Mycorrhiza**, v. 11, n. 4, p. 207-211, 2001.

KHAN, Sumera Afzal et al. Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 829-833, 2009.

LATCH, G. C. M.; HUNT, W. F.; MUSGRAVE, D. R. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. **New Zealand journal of agricultural research**, v. 28, n. 1, p. 165-168, 1985.

LOUSADA, Júnia Maria; LOVATO, Maria Bernadete; BORBA, Eduardo Leite. High genetic divergence and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian campos rupestres. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 1, p. 45-53, 2013.

MENDONÇA, Míriam Pimentel; LINS, Livia Vanucci. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Fundação Biodiversitas, 2000.

OKI, Y.; FERNANDES, G. W.; CORREA JUNIOR, A. Fungos: amigos ou inimigos. **Ciência Hoje**, v. 42, n. 252, p. 64-66, 2008.

OKI, Y.; GOTO, B. T.; JOBIM, K.; ROSA, L. H.; FERREIRA, M. C.; COUTINHO, E. S.; XAVIER, J. H. de A.; CARVALHO, F.; MOREIRA, F. M. de S.; SOUZA, F. A.

de; BERBARA, R. L. L.; FERNANDES, G. W. **Arbuscular mycorrhiza and endophytic fungi in rupestrian grasslands**. In: FERNANDES, G. W. (Ed.). Ecology and conservation of mountaintop grasslands in Brazil. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. cap. 8, p. 157-179.

OKI, Yumi et al. The influence of the endophytic fungi on the herbivores from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

OLIVEIRA-FILHO, Ary T.; FLUMINHAN-FILHO, Miguel. Ecologia da vegetação do parque florestal Quedas do Rio Bonito. **Cerne**, v. 5, n. 2, p. 51-64, 1999.

PAGANO, M. C.; SCOTTI, M. R. A survey of the arbuscular mycorrhiza occurrence in *Paepalanthus bromelioides* and *Bulbostylis* sp. in rupestrian fields, Brazil. **Micologia Aplicada International**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2009.

PAGUIA, E. F.; VALENTINO, M. J. G. Seed germination promoting activity of fungal endophytes in Rice (*Oryza sativa* L.) seeds. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 6, n. 4, p. 37-39, 2016.

PINTO, Angelo C.; DA SILVA, Rosaly S.; VALENTE, Ligia MM. Diterpenes from *Vellozia nanuzae*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 12, p. 3909-3911, 1988.

PRINS, Cláudia L.; VIEIRA, Ivo JC; FREITAS, Silvério P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 91-102, 2010.

RODRIGUES, Rogério Leonardo. Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. F.(Velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins. 2010.

ROHDEN, Jéssica Ferreira. Espécies recomendadas e suas prioridades para restauração campestre do cerrado. 2014.

RUDGERS, Jennifer A.; KOSLOW, Jennifer M.; CLAY, Keith. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, v. 7, n. 1, p. 42-51, 2004.

VAZ, Aline BM et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1381-1391, 2009.

VIEIRA, Mariana LA et al. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian journal of microbiology**, v. 60, n. 12, p. 847-856, 2014.

ZAFERANLOO, Bitra et al. Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.